



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

DESARROLLO DE UN MÉTODO AUTOMÁTICO DE  
MEDIDA DEL CALIBRE VASCULAR RETINIANO.  
EVOLUCIÓN DESDE UN SISTEMA MANUAL A LA  
AUTOMATIZACIÓN

Tesis Doctoral

**MARÍA RODRÍGUEZ BLANCO**

Santiago de Compostela, 2013





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO AUTOMÁTICO DE  
MEDIDA DEL CALIBRE VASCULAR RETINIANO.  
EVOLUCIÓN DESDE UN SISTEMA MANUAL A LA  
AUTOMATIZACIÓN.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

**MARÍA RODRÍGUEZ BLANCO**

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS PROFESORES:

**FRANCISCO JAVIER GÓMEZ-ULLA DE IRAZAZÁBAL**

**MANUEL FRANCISCO GONZÁLEZ PENEDO**

**SANTIAGO DE COMPOSTELA, 2013.**





Don Francisco Javier Gómez-Ulla de Irazazábal, Catedrático de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Don Manuel Francisco González Penedo, profesor Titular de la Facultad de Informática de la Universidad de La Coruña.

CERTIFICAN:

Que Doña María Rodríguez Blanco, Licenciada con Grado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: **“Desarrollo de un método automático de medida del calibre vascular retiniano. Evolución desde un sistema manual a la automatización”**.

Considerando concluido el trabajo y la redacción de sus conclusiones, autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor ante el tribunal encargado de juzgarlo, y a los efectos oportunos firman el presente certificado.

Santiago de Compostela, Febrero de 2013

**Prof. Francisco Javier Gómez-Ulla de Irazazábal**

**Prof. Manuel Francisco González Penedo**



A mi padre







# Agradecimientos

---



Mi agradecimiento a todos los que de alguna manera, habéis participado en este trabajo:

Al Profesor Francisco Javier Gómez Ulla de Irazazábal que estuvo dirigiendo todos los pasos de este trabajo. Esta tesis no habría sido posible sin su paciencia, tesón y constancia.

Al Profesor Manuel Francisco González Penedo, a Sonia González, a Noelia Barreira y a todos los pertenecientes al grupo VARPA de la facultad de Informática de la Universidad de La Coruña, todos han hecho posible que esta idea se haya podido llevar a la práctica.

A los miembros del Servicio de Medicina Interna del Hospital de Conxo que han colaborado con nosotros, en especial a Antonio Pose Reino y Marta Pena.

A Mónica Fernández Ratón por desarrollar el método estadístico de un modo tan riguroso y a la vez tan sencillo de comprender.

A Alejandro y Sabela por su gran ayuda y apoyo constante.

A mis padres. Gracias.







# Índice

---



## Índice:

<b>Justificación, Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>23</b>
1. ANATOMÍA DE LA CIRCULACIÓN OCULAR.....	25
2- LA AUTORREGULACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO RETINIANO .....	30
3-MÉTODOS DE MEDIDA DEL CALIBRE ARTERIOVENOSO .....	37
4. MEDICIÓN AUTOMÁTICA DEL IAV.....	46
5-IMPORTANCIA DE LA MEDIDA DEL CALIBRE ARTERIO-VENOSO.....	50
<b>Material y método .....</b>	<b>53</b>
1. GRUPOS MUESTRALES .....	55
2. DESARROLLO DE UN PROGRAMA INFORMÁTICO .....	57
3. MEDICIÓN DEL IAV .....	59
3.a. Método manual .....	61
3.b. Método automático de medición del IAV .....	66
4. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	71
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	74
<b>Resultados.....</b>	<b>77</b>
<b>EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DE LAS MEDIDAS INTRA E INTEROBSERVADOR Y COMPARACIÓN ENTRE LAS MEDIDAS TOMADAS CON DIFERENTES RETINÓGRAFOS. ....</b>	<b>79</b>
1. Estudio de las diferencias en el IAV dependiendo del observador que efectúa las mediciones y de la retinografía empleada .....	79
2. Grado de acuerdo y correlación entre las diferentes retinografías realizadas por el observador 1 .....	83
3. Grado de acuerdo y correlación entre las diferentes retinografías realizadas por el observador 2 .....	99
4. Grado de acuerdo y correlación lineal entre los dos observadores.....	115

<b>EXPERIMENTO 2: VALIDACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE MEDICIÓN BASADO EN SNAKES.....</b>	<b>116</b>
1. Índice <i>Snake</i> .....	117
2. Índice lineal.....	119
3. Índices lineal y <i>Snake</i> .....	121
4. Grado de acuerdo y correlación.....	126
<b>EXPERIMENTO 3: COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES FÓRMULAS Y TIEMPOS. ....</b>	<b>147</b>
1. Diferencias entre las mediciones según la fórmula utilizada y el instante temporal analizado.....	147
2. Correlaciones entre las diferentes fórmulas .....	149
3. Grado de acuerdo entre las diferentes fórmulas .....	156
<b>EXPERIMENTO 4: MÉTODO AUTOMÁTICO. ....</b>	<b>164</b>
1. Cálculo de las medidas de validez del método automático .....	164
2. Estudio comparativo entre el método manual y automático .....	167
<b>Discusión .....</b>	<b>171</b>
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	176
<b>Conclusiones .....</b>	<b>187</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>191</b>



# Justificación, Hipótesis y Objetivos

---



Diversas patologías sistémicas y procesos fisiológicos como el envejecimiento producen cambios en el calibre de los vasos retinianos. Estos cambios son evaluados mediante oftalmoscopia comparando el calibre de las arterias retinianas con el de las venas a través de lo que se conoce como Índice Arterio-Venoso (IAV) (1-5), que es el resultado del cociente de la suma de los calibres arteriales partido por la suma de los calibres venosos. De hecho, los vasos retinianos son la única estructura vascular del cuerpo que puede ser vista directamente y de forma no invasiva. Las alteraciones en la vascularización retiniana pueden reflejar el grado de daño vascular debido a enfermedades sistémicas como la Hipertensión Arterial (HTA), la arterioesclerosis o la Diabetes Mellitus (DM), entre otras.

Por otro lado, las arteriolas retinianas muestran características anatómicas similares a la circulación cerebral y coronaria y se han querido utilizar como marcador del estado y riesgo de enfermedad cardiovascular o cerebrovascular (6-8). Los cambios en el calibre vascular retiniano pueden dar importante información sobre el estado de la microcirculación en el ojo y en otros lechos vasculares y además es el signo más precoz de retinopatía hipertensiva; sin embargo, la subjetividad, la dificultad de detectar cambios incipientes y la falta de reproducibilidad del método exploratorio entre diversos observadores o incluso en el mismo observador, hacen que la exploración rutinaria del fondo de ojo mediante oftalmoscopia para detectar alteraciones del IAV (9, 10) sea muy susceptible a errores. Por este motivo, diferentes investigadores han desarrollado métodos cuantitativos para detectar estos cambios de calibre a partir de fotografías de fondo de ojo (6, 11).

Es frecuente que los servicios de Medicina Interna, Endocrinología o las unidades de HTA soliciten la evaluación del fondo de ojo a sus pacientes. En el caso de la HTA, el diagnóstico precoz y la eficacia de los tratamientos antihipertensivos hacen que, en un porcentaje elevado de estos pacientes, no se detecte patología vascular retiniana; por otro lado, en los casos en los que la repercusión de la enfermedad sobre el árbol vascular retiniano es evidente (estrechamientos focales, cruces arteriovenosos patológicos severos, cambios

marcados en el reflejo luminoso arteriolar, exudados algodonosos, hemorragias de retina, exudados duros o incluso edema de papila), la valoración del calibre vascular pasa a segundo plano, y todo ello hace que se haya puesto en duda la validez de los métodos previamente mencionados (12).

Los cambios en el calibre vascular retiniano también se relacionan con otras patologías sistémicas diferentes de la hipertensión, entre las que destaca la DM entre otras (13-17).

De las primeras clasificaciones de las alteraciones retinianas provocadas por la HTA todavía vigentes en la actualidad (**Keith 1939, Wagener 1939, Scheie 1953, Leishman 1957**)(3, 18, 19), los estadios precoces, especialmente el estrechamiento arteriolar, son los que presentan una mayor subjetividad y una menor reproducibilidad en su valoración como ya hemos comentado anteriormente. **Kagan** (20) describió variaciones importantes en la valoración de las distintas lesiones retinianas mediante oftalmoscopia entre el mismo observador (10-33%) o entre distintos observadores (20-42%) por lo que se hace necesaria la existencia de un método objetivo y reproducible que mida esos primeros cambios en el calibre vascular relacionados con la hipertensión y también con otras enfermedades.

**Pose, Gómez-Ulla et al** (21-23) han desarrollado y publicado en **2005** un método de medición del IAV semiautomático con una buena reproducibilidad intra e interobservador, y este método es la base del sistema que proponemos a continuación. Las principales diferencias entre ambos métodos son dos:

- La imágenes que se utilizaron inicialmente (21, 22) eran en blanco y negro, actualmente se trabaja con imágenes tanto en blanco y negro como en color.

- En los primeros estudios (21, 22), para la detección de los bordes de los vasos se empleaba una aproximación lineal, de modo que se obtenían dos rectas que limitan cada segmento vascular y la distancia entre ambas era el ancho del vaso que posteriormente se empleaba para la determinación del IAV. Sin embargo se sabe que la dirección de los vasos no es rectilínea sino que en su



camino radial hacia el nervio óptico va realizando pequeños cambios en su trayectoria de modo que su camino es sinuoso como el de una serpiente, de ahí el nombre para el nuevo método de medición, el método *Snake* (24) que sigue la dirección real del vaso y realiza múltiples mediciones en el segmento escogido de modo que el grosor en ese segmento sea la media de todas esas mediciones logrando por tanto una aproximación más real al grosor verdadero del vaso en ese punto.

### HIPÓTESIS

- La medida del calibre vascular retiniano obtenida en imágenes del fondo de ojo no debería verse influenciada por el cambio en la obtención de las imágenes en color o en blanco y negro ni por el retinógrafo empleado para la captura de imágenes.
- Podría existir una equivalencia entre el método de determinación del IAV semiautomático basado en el cociente entre la media de los calibres arteriales y la media de los calibres venosos empleado en este trabajo y el método Hubbard- Parr/Hubbard- Parr Revisado.
- La determinación semiautomática del IAV podría ser equivalente a un nuevo método de determinación del IAV totalmente automatizado.

Los OBJETIVOS del presente trabajo son los siguientes:

- 1- Comparar las mediciones del IAV retiniano a partir de fotografías de fondo de ojo realizadas con cuatro retinógrafos diferentes (Experimento 1).
- 2- Comparar el método lineal, método de medición validado hasta el momento con un nuevo sistema de medición, el método *Snake*. (Experimento 2).

- 3- Comparar la evolución del IAV en una cohorte de pacientes hipertensos antes y 6 meses después de un tratamiento antihipertensivo (Experimento 2).
- 4- Demostrar que nuestro método de medición es equivalente al método de Hubbard-Parr, que es el método de medición del IAV más ampliamente empleado en los estudios clínicos publicados al respecto (Experimento 3).
- 5- Desarrollar un método de medición del IAV totalmente automático y equivalente al método semiautomático previamente propuesto y validado (Experimento 4).





# Introducción

---



## **1. ANATOMÍA DE LA CIRCULACIÓN OCULAR**

En la irrigación del ojo participan dos sistemas vasculares separados: los vasos retinianos y los vasos uveales o ciliares (25). Estos últimos incluyen los vasos del iris, del cuerpo ciliar y de la coroides. La función principal de la coroides es irrigar la retina externa.

En los seres humanos, los vasos oculares derivan de la arteria oftálmica, que a su vez derivan de la carótida interna. La arteria oftálmica se ramifica en la arteria central de la retina, arterias ciliares posteriores y varias arterias ciliares anteriores.

La arteria central de la retina entra en el nervio óptico aproximadamente 10 milímetros por detrás del globo ocular y aparece dentro del ojo a nivel de la papila óptica, desde donde se ramifican en cuatro vasos mayores, cada uno de los cuales irriga un cuadrante de la retina. Las pequeñas arteriolas y venas se interdigitan de una forma característica dentro de la retina. Alrededor de las arteriolas existe una zona sin capilares, probablemente debido a la tensión local de oxígeno, que causa remodelación vascular durante la maduración.

En los seres humanos, los contenidos de la órbita reciben irrigación vascular desde varias arterias incluidas las arterias oftálmica, la arteria meningolacrimal (una rama de la arteria meníngea media), y las arterias palpebrales (que salen de la arteria facial). La arteria meníngea media y la arteria facial forman parte del sistema carotídeo externo. La arteria oftálmica proporciona la mayor parte de la irrigación del ojo y es la primera rama de la arteria carótida interna, desde donde surge cuando ésta gira para atravesar la duramadre y salir de seno cavernoso. La irrigación vascular del nervio óptico intraorbitario, la retina y la coroides proviene, sobre todo, de la circulación arterial oftálmica a través de las arterias ciliares posteriores, de la arteria central de la retina y de la red vascular pial en torno al nervio óptico. La arteria oftálmica sale de la cavidad intracraneal por el canal

óptico y, en la mayoría de los individuos, se sitúa inferolateral al nervio óptico. Esta arteria tiene varios vasos colaterales intraorbitarios con el sistema arterial carotídeo externo, de los que las más importantes son las anastomosis lagrimal y etmoidal. Las ramas oculares de la arteria oftálmica son la arteria central de la retina y de uno a cinco troncos ciliares posteriores. Estos troncos, a su vez, se ramifican en las arterias ciliares posteriores principales. La mayor parte de los individuos presentan dos o tres troncos ciliares posteriores que originan las arterias ciliares posteriores medial y lateral. Cada una de las arterias ciliares posteriores principales se divide en varias arterias ciliares posteriores cortas, justo antes o después de entrar en la esclerótica. Además, desde los troncos ciliares salen las arterias ciliares posteriores largas medial y lateral, que viajan por la parte externa del globo hacia la parte anterior, antes de penetrar en la esclerótica a nivel del meridiano horizontal del globo. Las arterias ciliares posteriores largas irrigan el iris, el cuerpo ciliar y la región anterior de la coroides.

Las arterias ciliares posteriores cortas, tras salir de la arteria ciliar posterior principal, discurren en dirección anterior y perforan la esclerótica inmediatamente adyacente al nervio óptico, sobre todo en la región nasal y temporal. En ocasiones, las arterias ciliares posteriores cortas pueden presentar anastomosis extraesclerales. Estas arterias irrigan la coroides posterior y la mayor parte del nervio óptico anterior. El tamaño y la forma del área de la coroides y del nervio óptico irrigados por cada arteria ciliar posterior corta varía de un individuo a otro, e incluso entre los dos ojos de un mismo individuo. Algunas arterias ciliares posteriores cortas se dirigen, sin ramificarse, a través de la esclerótica, directamente a la coroides, mientras que otras se dividen en la esclerótica y dan ramas para la coroides y el nervio óptico anterior. Con frecuencia, las arterias ciliares posteriores cortas lateral y medial se anastomosan y forman un círculo elíptico alrededor del nervio óptico, que se denomina círculo arterial de Zinn y Haller. Las ramas derivadas del círculo de Zinn y Haller comprenden las ramas piales recurrentes, las ramas coroideas y las ramas que penetran en el nervio óptico. Este círculo arterial suele ser intraescleral, aunque, en ocasiones, existe una red arterial extraescleral incompleta. Los moldes por corrosión intervasculares en

seres humanos han demostrado que las anastomosis entre las arterias ciliares posteriores cortas medial y lateral forman un círculo elíptico completo alrededor del nervio óptico en un 77% e los ojos, pero que un 43% de estos ojos tienen segmentos estrechos en estas anastomosis interarteriales.

Por lo general, el drenaje venoso de la órbita no se corresponde con la irrigación arterial. Las venas de la órbita, igual que las de la cabeza y el cuello, no contienen válvulas. La vena orbitaria más larga es la oftálmica superior, que recibe la mayor parte del retorno venoso orbitario. El drenaje venoso de la retina y del nervio óptico anterior se realiza, casi exclusivamente, a través de la vena central de la retina y de sus tributarias, que a su vez se vacían en la vena oftálmica superior. La mayor parte de la coroides drena a través de las venas vorticosas, que desembocan en las venas oftálmicas superior e inferior. Con frecuencia resulta difícil identificar una vena oftálmica inferior independiente de la superior; por lo general existen numerosas anastomosis entre ellas. Ambos vasos drenan en el seno cavernoso. No obstante, en ocasiones la vena oftálmica inferior drena en el plexo pterigoideo a través de la hendidura orbitaria inferior.

Los vasos retinianos se distribuyen en los dos tercios internos de la retina, mientras que el tercio externo, incluidos los fotorreceptores, es avascular y se nutre desde la coroides. En el centro de la fovea se encuentra una zona avascular, que permite que la luz llegue a los fotorreceptores centrales sin encontrar un solo vaso sanguíneo en su camino. Las arterias y venas se localizan dentro de la capa de fibras nerviosas. Los capilares se distribuyen de forma laminar, con dos capas de red capilar fina en una gran parte de la retina. En la parte central de la retina, estas redes capilares son densas y pueden llegar a estar constituidas por tres o cuatro capas, mientras que las redes periféricas son menos densas y se limitan a una sola capa. La retina interna periférica extrema es avascular. Una capa superficial separada, la capa de capilares peripapilares radiales, se extiende desde la papila óptica, siguiendo sus extensiones principales una dirección temporal superior e inferior. A veces puede apreciarse una arteria cilioretiniana. Se trata de una rama directa de las arterias ciliares, que emerge desde el borde de la excavación papilar e irriga una pequeña área de la retina.

La parte retrobulbar del nervio óptico está irrigada por ramas de la arteria central de la retina y por vasos piales, mientras que la parte intraocular de nervio no recibe ramas de la arteria central de la retina, excepción de la capas papilares más superficiales. El resto de la parte anterior del nervio óptico y de la lámina cribosa reciben irrigación principalmente desde ramas directas de las arterias coroideas y de las arterias ciliares posteriores cortas. La coriicapilar peripapilar no contribuye a la vascularización del nervio óptico. Las arterias ciliares posteriores se ramifican detrás del globo ocular en 10-20 arterias ciliares posteriores cortas y, como regla general, en dos arterias ciliares posteriores largas. Las arterias ciliares posteriores cortas perforan el polo posterior de la esclerótica y forman la red coriicapilar, una red densa, constituida por una sola capa, adyacente a la membrana de Bruch y al epitelio pigmentario de la retina. En el polo posterior, la red coriicapilar se dispone de forma lobular con arteriolas nutricias alternando con vénulas de drenaje, y la transición entre la arteriola y la coriicapilar es inusualmente abrupta. En el área ecuatorial y la periferia la disposición lobular se ve reemplazada de forma gradual por un patrón en huso o escalera. En la coroides humana se han observado cortocircuitos interarteriales e intervenosos entre los vasos de calibre mediano. Cada arteria ciliar posterior larga suministra sangre a un sector de la coroides periférica nasal y temporal respectivamente.

La circulación venosa retiniana drena en la vena central de la retina, que sale del ojo a través del nervio óptico y drena a su vez en el seno cavernoso. Como regla general, la coroides drena en las venas vorticosas, aunque existen comunicaciones anastomóticas menores con los vasos epiesclerales anteriores. El humor acuoso drena en estos vasos epiesclerales desde los canales colectores que salen del canal de Schlemm. Estas venas epiesclerales, que contienen humor acuoso, fueron descritas por Ascher.

Mediante la oclusión experimental de las arterias retinianas en cerdos se ha demostrado que éstos son vasos terminales, sin anastomosis. Por tanto, la oclusión de los vasos retinianos destruye la capa retiniana interna. Si la isquemia ocular dura más de una hora se produce un daño irreparable. La oclusión de las arterias coroideas destruye las capas externas de la retina. Los cortocircuitos



interarteriales entre las arterias coroideas de calibre mediano pueden reducir la lesión causada por la oclusión de una única arteria coroidea de calibre mediano o grande, pero la continuidad anatómica de la coriocapilar no previene la isquemia coroidea. La oclusión de una arteriola coroidea terminal no puede compensarse con aporte de flujo a través de las vénulas adyacentes, porque no se mantiene un gradiente de presión adecuado que promueva este flujo sanguíneo.



## **2- LA AUTORREGULACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO RETINIANO:**

### CONCEPTO

El objetivo de la autorregulación en un tejido es el mantenimiento de un flujo sanguíneo constante durante los cambios en la presión de perfusión de dicho tejido.

Hoy en día, el mecanismo exacto de la autorregulación sigue siendo algo desconocido, aunque se cree que opera a través de cambios en la resistencia vascular. Esto consiste en la constricción del árbol vascular ante un aumento de la presión de perfusión o en la dilatación de dicho árbol si la presión de perfusión baja, manteniendo siempre constante el flujo tisular.

Ante la confirmada ausencia de inervación simpática en las arteriolas retinianas, numerosos estudios han demostrado la existencia de la autorregulación (26-30).

### MECANISMO

Actualmente se piensa que el control de la circulación retiniana ocurre a cargo de la autorregulación, que a su vez podría actuar desde la microcirculación retiniana a través de los siguientes mecanismos:

1- Un mecanismo miogénico (autorregulación por presión): El aumento de presión transmural causa un aumento del tono muscular arteriolar protegiendo la arteriola de la dilatación y manteniendo el flujo sanguíneo.

2- Un mecanismo metabólico (autorregulación metabólica): el tono vascular se ajusta según las necesidades metabólicas locales. Los mensajeros químicos que indican el estado del metabolismo son la  $PO_2$ ,  $PCO_2$ , pH o lactato.

Así por ejemplo, la inhalación de  $O_2$  produce una constricción de las arteriolas retinianas (31) y el descenso del pH extracelular eleva linealmente la perfusión ocular (32).

Según los fisiólogos cuando se habla de autorregulación estamos hablando de un mecanismo de mantenimiento del flujo sanguíneo ante los cambios en la presión de perfusión de un tejido, mientras que si hablamos de la habilidad de un órgano para mantener su nutrición constante según la concentración local de metabolitos, estamos hablando de regulación. La regulación es un mecanismo lento que puede tardar minutos antes de ser efectivo. A nivel de la retina se puede pensar que el componente miogénico (autorregulación) probablemente actúa como una respuesta rápida a los cambios de presión en las arteriolas retinianas hasta que se pone en marcha el segundo mecanismo metabólico (regulación), más lento y más fino, que comienza a ser efectivo a los dos minutos en los capilares retinianos (28).

Tanto el mecanismo miogénico como el metabólico actúan a través del tono vascular. Este tono depende de la fibra muscular lisa y de los pericitos, lo que puede ser regulado por los factores derivados del endotelio (33).

En las últimas décadas se ha hablado de varios factores endoteliales, tanto de los inhibidores de la contracción vascular (óxido nítrico, prostaciclina...) como de los que favorecen la contracción vascular y facilitan la proliferación de la fibra muscular lisa (Endotelina, Tromboxano A<sub>2</sub>, Prostaglandina H<sub>2</sub>...)

En la mayoría de las enfermedades vasculares sistémicas existe una función endotelial defectuosa en la circulación periférica (incluida la retiniana) dando lugar a un desequilibrio en la formación de los factores endoteliales. De estas enfermedades cabe destacar:

-La HTA: Se asocia a una disminución en la producción de óxido nítrico (34, 35) y a una menor capacidad de vasodilatación endotelial (36, 37).

-Arterioesclerosis: Se asocia a un aumento de los niveles circulatorios y vasculares de la endotelina (38).

Otras enfermedades vasculares sistémicas que pueden causar una disfunción endotelial son la hipercolesterolemia, diabetes, síndromes vasoespásticos... etc.

De todo lo anterior podemos concluir que, a través de la secreción local de sustancias vasoactivas, las células endoteliales pueden modular el tono vascular local tanto en condiciones basales como en respuesta a factores mecánicos y metabólicos locales. En la circulación retiniana, el óxido nítrico y la endotelina-1 son importantes reguladores del flujo sanguíneo. Una disfunción de este sistema puede contribuir de manera importante en las alteraciones producidas a nivel del árbol vascular retiniano que ocurren en la hipertensión, diabetes, arterioesclerosis, isquemia o vasoespasmo.

La autorregulación opera dentro de un rango determinado de presión de perfusión. Ante aumentos o caídas de la presión de perfusión por encima o por debajo de los límites críticos de este rango, la autorregulación se rompe siendo incapaz de proteger al tejido retiniano.

Hay determinadas condiciones patológicas en las que este rango puede ser modificado para operar a un nivel más bajo o más alto. Así por ejemplo en la HTA Crónica la autorregulación se ajusta a un nivel más alto para adaptarse a la presión sanguínea. Este cambio hace que el enfermo tolere mejor la elevada presión sanguínea pero al mismo tiempo empeora su tolerancia a una bajada de la presión arterial (39, 40).

Ante una subida aguda de la presión arterial, la arteriola retiniana responde contrayéndose gracias a la autorregulación y cuando la tensión arterial vuelve a la normalidad, ésta se vuelve a dilatar.

En enfermos con HTA crónica y/o en el envejecimiento fisiológico, la arteriola retiniana se va esclerosando y perdiendo su capacidad de volver a dilatarse, de modo que se pierde la capacidad de autorregulación (29).

Histológicamente se produce un aumento del grosor de la túnica media secundaria a una hiperplasia de las células musculares lisas. Esta hiperplasia hace que la arteria aumente su capacidad de vasoconstricción y que sea más sensible a estímulos vasopresores como la angiotensina o la noradrenalina. La disminución de la luz arteriolar debida tanto a las alteraciones estructurales de la pared como al aumento de la capacidad de constricción, produce un incremento sostenido de la resistencia periférica, lo que hace que en esta fase inicial la circulación de la red capilar y la perfusión sanguínea de la retina en el paciente hipertenso sean normales. Este es el proceso fisiológico de la fase inicial de la hipertensión arterial. El nivel de la tensión arterial no suele ser muy elevado y permite el mecanismo normal de la autorregulación. Pero esto sólo ocurre en pacientes relativamente jóvenes, ya que el envejecimiento por si mismo produce en las arteriolas la sustitución progresiva de la capa muscular por material hialino (arterioesclerosis involutiva), y por este motivo cuando se produce hipertensión en pacientes ancianos no ocurre la vasoconstricción ni la hiperplasia de la túnica media. En las hipertensiones secundarias, dado que suelen presentarse en individuos más jóvenes, la vasoconstricción es muy manifiesta pero como la elevación tensional es muy brusca e intensa, el mecanismo de autorregulación fracasa rápidamente.

El correlato oftalmoscópico de esta situación consiste en una disminución generalizada del calibre vascular. Las arteriolas aparecen estrechas y rectas llegando a hacerse casi invisibles en su porción más periférica. La relación del calibre arteria-vena se descompensa a favor de las venas pues en ellas no se produce ningún tipo de vasoconstricción. En fases más avanzadas las venas pueden parecer dilatadas o incluso tortuosas.

La elevación de la presión arterial sistémica puede alcanzar niveles que provocan daños en la pared del vaso y hacen imposible mantener el mecanismo de autorregulación. El aumento brusco e importante de la presión sanguínea en la luz de la arteriola somete a la pared del vaso a un doble estrés. Por un lado tenemos el roce que se produce con el deslizamiento de la columna sanguínea y por otro lado la presión que se ejerce sobre la pared del vaso directamente desde

la luz del vaso. Por este mecanismo se produce un daño endotelial y un cambio en la estructura de la pared del vaso. La estructura normal es sustituida por un material homogéneo que posee características histoquímicas de fibrina y es lo que se conoce por alteración fibrinoide. En las zonas en las que existe esta alteración se pierde la capacidad de autorregulación, de manera que el vaso no responde a la hipertensión con vasoconstricción, y se produce también una ruptura de la barrera hematorretiniana originándose una perversión de la permeabilidad de la pared del vaso que es el sustrato de la que puede denominarse fase exudativa de la retinopatía, caracterizada por el edema, los exudados y las hemorragias.

### NUEVOS CONCEPTOS FISIOLÓGICOS

En los últimos años, están apareciendo nuevos conceptos sobre la fisiología del árbol vascular retiniano que intentan explicar mejor el fenómeno de la autorregulación:

-**Douglas Anderson** (29) habla de la existencia de receptores alfa y betaadrenérgicos, colinérgicos y de angiotensina. Parece extraño que unos vasos sin innervación tengan receptores para estos neurotransmisores, y más sabiendo que la barrera retiniana impide cualquier paso de estos agentes desde la luz vascular hacia la capa de fibras musculares lisas. Se piensa que estos receptores entran en acción ante situaciones patológicas que dañan la barrera endotelial, permitiendo la difusión de estas sustancias desde la luz vascular hacia la fibra muscular lisa y los pericitos.

-Otro concepto es el de **vasomoción retiniana** (41) que es un mecanismo de regulación de la microcirculación capilar a través de unas ondas de contracción vascular que dan lugar a la alternancia de contracciones y dilataciones de la arteriola precapilar y de ese modo permiten regular la perfusión en la unidad microcirculatoria adyacente. La vasomoción en el sistema vascular retiniano apenas ha sido estudiada, pero su existencia puede inferirse al hecho de que la  $pO_2$  oscila rítmicamente con una frecuencia correspondiente a la

vasomoción en los microvasos cerebrales (42), y no se conoce ningún otro mecanismo que pueda generar oscilaciones en la tensión de oxígeno tisular con esa frecuencia. Este mecanismo se está empleando para explicar sobre todo la maculopatía diabética, pero hasta hoy en día no se ha relacionado con la patogenia de la retinopatía hipertensiva (41).

#### ESTRECHAMIENTO GENERALIZADO DE LAS ARTERIOLAS RETINIANAS

Basándonos en la histofisiología del árbol vascular retiniano llegamos a la conclusión de que, ante cambios en la presión de perfusión retiniana, las arteriolas retinianas son capaces de mantener el flujo sanguíneo retiniano a través de cambios en su resistencia.

El factor fundamental que determina el grado de resistencia vascular es el diámetro arteriolar. El diámetro cambia para regular el flujo sanguíneo retiniano tanto en situaciones agudas como crónicas. En las situaciones agudas de aumento en la presión de perfusión retiniana, el calibre arteriolar tiene que disminuir para aumentar la resistencia vascular. Esto ocurre gracias a una contractura tónica fisiológica reversible controlada por la autorregulación arteriolar. En las situaciones crónicas de aumento de la presión de perfusión retiniana, la necesidad de una resistencia vascular aumentada mantenida conduce a cambios estructurales histológicos (esclerosis arteriolar) dando lugar a una disminución definitiva y a veces progresiva del árbol vascular.

En resumen, la disminución del calibre arteriolar retiniano es un signo valioso que puede ser debido a dos causas:

1-Contractura fisiológica reversible normalmente debida a una subida aguda e importante en la TA (síndrome vascular hipertonico-hipertensivo)

2-Esclerosis arteriolar generalizada que normalmente es debida a agresiones crónicas como HTA crónica (arterioesclerosis involutiva o síndrome vascular esclerohipertensivo) o al envejecimiento (arterioesclerosis involutiva)

El calibre venoso se mantiene mucho más estable que el arteriolar ante estas agresiones fundamentalmente por dos razones:

- Las vénulas carecen de fibra muscular lisa (31, 43)

- Las vénulas no disponen de la misma capacidad de respuesta endotelial que la arteriolas retinianas (33).





### **3-MÉTODOS DE MEDIDA DEL CALIBRE ARTERIOVENOSO**

Es de sobra conocida la relación existente entre las alteraciones en el calibre vascular retiniano y las patologías vasculares sistémicas como la HTA o la arterioesclerosis. Muchos oftalmólogos trataron de medir este parámetro a través de la medida del grosor vascular mediante fotografías de fondo de ojo, sin que ninguno de esos métodos sea totalmente satisfactorio.

Hasta los años ochenta, el árbol vascular retiniano tenía que ser localizado manualmente y medido también de modo manual a partir de las fotografías de fondo de ojo. Las primeras técnicas computarizadas permitían a los usuarios medir los diámetros de los vasos a partir de que éstos indicaran dos puntos en los bordes de los vasos de las imágenes, de modo que se requería personal experimentado para realizar las mediciones. Actualmente se han desarrollado nuevos métodos semiautomáticos que ya no necesitan que el usuario identifique los bordes de los vasos. Sin embargo a pesar de las múltiples aplicaciones creadas para la medición del calibre de los vasos, se necesita poner más atención para desarrollar sistemas eficientes con los que se obtengan resultados reproducibles y fiables.

**Boyd y Margerie en 1960** (44) midieron el ancho de las cuatro ramas principales de la arteria central de la retina y calcularon un grosor medio del árbol arteriolar retiniano. Se encontró una reducción del grosor medio en relación con la edad y el aumento de presión arterial pero con mucha dispersión en los datos.

**En 1963 Hill y Dollery** (30) midieron el calibre de arteriolas retinianas de todos los grosores antes y después de cambios de presión arterial y observaron que aumentos de presión arterial se correlacionan con disminución del calibre de vasos pequeños.

**En 1967 Kagan, Aurell y Tibblin** (45) estudiaron el calibre vascular retiniano en fotografías de fondo de ojo. Encontraron que la suma de grosores de

todos los vasos arteriales y venosos que pasaban por un círculo concéntrico al nervio óptico era menor en los hipertensos que en los normotensos pero el rango de valores obtenidos era grande.

**En 1968 Ramalho y Dollery (31)** midieron el diámetro vascular retiniano después de descenso de la presión arterial e inhalaciones de oxígeno esperando encontrar una disminución en el calibre vascular de arterias y venas pero no pudieron encontrar diferencias en el calibre vascular entre individuos normales e hipertensos.

**Hodge, Parr y Spears en 1969 (46)** compararon 4 métodos de medida del calibre vascular retiniano en fotografías de fondo de ojo. El método más consistente de los cuatro fue en el que se empleó un micrómetro ocular para medir el grosor de los vasos una vez vista la foto del fondo magnificada a través de un microscopio de baja potencia. Este método fue encontrado significativamente ( $p < 0.01$ ) más consistente que los otros tres. Con este método la medida se puede hacer con un error  $< \pm 3$  micras ( $\mu$ ). En este mismo estudio se vio que el grosor de los vasos retinianos hallado en el negativo de las fotos era menor que en su positivo (el grosor medio de todas las fotos negativas fue  $93,83 \mu$  y de las positivas fue de  $95,07 \mu$   $p < 0,01$ ). También se encontró que los vasos tienen menor grosor en las imágenes obtenidas con angiografías fluoresceínicas que con las imágenes estándar, hablando de un efecto vasoconstrictor de la fluoresceína sobre el vaso retiniano. La falta de un método satisfactorio de medida del calibre vascular se debía a varias razones; primero, no se deben considerar los vasos principales para el cálculo del calibre arteriolar ya que los vasos que realmente se afectan en enfermedades como la hipertensión son los de pequeño calibre; segundo, el número y el modo de división de las ramificaciones pueden influir en el grosor final si empleamos las fórmulas clásicas que son la suma de grosores de vasos y la suma de grosores de los cuadrados.

**Sánchez Salorio en 1971(47)** halla el IAV ampliando diapositivas de fondo de ojo a través de un proyector, dibujando un disco de 10 cm de diámetro al que se le superpone la papila óptica. Concéntricamente a este círculo, se traza uno

mayor, cuyo radio es igual al diámetro del círculo menor. Este círculo mayor, una vez proyectada la diapositiva, nos informa de los puntos en donde debemos medir el calibre de los grandes vasos, desechando los de calibre pequeño. A continuación se mide la anchura de los troncos arteriales y venosos, en el punto donde el círculo los corta y se suman los calibres arteriales y se dividen entre los calibres venosos. Esta técnica fue derivada de otras parecidas que, pese a ser diferentes y a ser descritas por distintos autores, encuentran cifras del IAV en individuos normales bastante concordantes. A modo de ejemplo, **Belmonte en 1961** encuentra que en sujetos normotensos el índice es de 0,7 a 0,8 y considera que la disminución del índice a cifras más bajas es un signo de hipertensión y probablemente de mal pronóstico.

**Parr y Spears desarrollan en 1974** (48, 49) un método de medición del calibre arterial que intenta evitar que la variabilidad interindividual en el número y patrón de ramificación de las arterias más grandes de la retina influya en la medida final del calibre vascular, de modo que sea posible la comparación entre calibres de diferentes individuos. Para ello desarrollan una fórmula para calcular el llamado Grosor equivalente de la Arteria Central de la Retina (CRAE). Se realizan fotografías de fondo de ojo centradas en la papila, se dibuja un círculo concéntrico a la misma y se mide el grosor de toda las arterias a este nivel. A continuación se dibuja un diagrama convergente hacia esos vasos y a partir de cada dos ramas convergentes se calcula el grosor del tronco padre hasta llegar al cálculo de CRAE a través de esta fórmula:

$$\hat{W} = (0.87w_1^2 + 1.01w_2^2 - 0.22w_1w_2 - 10.76)^{1/2}$$

$W_1$  es el grosor de la rama arteriolar más pequeña

$W_2$  es el grosor de la rama arteriolar más grande

$\hat{W}$  es el grosor del tronco padre

Esta fórmula es empleada en 80 ojos de 40 individuos sanos y el valor del grosor de CRAE obtenido es de  $175 \pm 14$  micras. Se comparó esta ecuación con la

suma de los grosores arteriales y el cuadrado de la suma de los grosores arteriales y se vio que la fórmula de Parr-Spears presentaba una dispersión 50% y 100% menor que dichas fórmulas respectivamente. Se estudió además el grosor de 189 bifurcaciones de ramas arteriales derivadas de la arteria central de la retina en fotografías de 51 pacientes. En 29 de esos pacientes, a través del análisis de 126 ramificaciones, fue hallado el coeficiente de ramificación y los radios del grosor de cada 2 ramas con el radio de su tronco original. Así se halló la fórmula para deducir el grosor del tronco original a partir de sus dos ramas, una más grande y una más pequeña. Esta fórmula fue comprobada en las 11 personas restantes en 63 ramificaciones.

**Brinchmann-Hansen y cols 1986** (50) , obtuvieron mediciones de 20 fotografías en blanco y negro del mismo fondo de ojo de un varón de 35 años. Mediante un método microdensitométrico hallaron el calibre de tres arterias y tres venas con un coeficiente de variación de un 3.6%.

**Delori y cols en 1988** (51) midieron la anchura de los vasos sanguíneos sobre imágenes de fondo de ojo tomadas bajo iluminación monocromática de 570 nanómetros. Compararon los resultados usando diversas mediciones mediante métodos micrométricos y microdensitométricos realizados por el mismo observador. El Coeficiente de Variación (CV) cambió de 1,6 al 2,85 con la primera técnica y osciló entre un 2,1 y 2,5% con el método densitométrico.

**Eaton y Hatchell en 1988** (52) miden la reproducibilidad intra e interobservador de la anchura de los vasos en retinas de gato usando angiografía fluoresceínica. Para ello utilizan negativos en los que se realiza un análisis computarizado de imágenes por el método de determinación automática de la distancia entre la mitad de los valores máximos entre píxeles. Este trabajo aconseja el uso de la angiografía para medir el diámetro interno de los vasos.

**George and cols** (53) usaron un procedimiento microdensitométrico para valorar la fiabilidad de las mediciones de la anchura de los vasos. Midieron negativos de fondo de ojo, tomados con luz anerita, reconstruyendo las

imágenes en blanco y negro y mostrándolas en un monitor. Se tomaron 10 fotografías de fondo de ojo de tres voluntarios sanos y se midió la anchura de la vena temporal superior en dos lugares en todos los negativos. El CV osciló entre 1,2% y 3,4% con una media de 2,2%.

**Meehan y cols en 1990** (54) usaron un programa automático trazador de vasos para identificar sus bordes. La longitud del segmento del vaso es seleccionada por el operador usando un cursor. La anchura promedio de un vaso se obtiene del promedio de cientos de diámetros medidos en 10 mediciones separadas. El porcentaje del CV sobre 11 fotografías del mismo sujeto tomadas por una cámara manual fue de 4% para las arterias y 3% para las venas. Esta variabilidad puede ser debida a la propia variabilidad de la línea digital debido al método utilizado de la detección automática de bordes.

**Newson en 1992** (55) publicó un método semiautomático de medición de la anchura de los vasos retinianos sobre fotografías en blanco y negro del fondo de ojo usando análisis de imagen. Promedió 16 fotogramas de vídeo consecutivos de la misma imagen. El ordenador calculó el perfil medio del nivel de grises a través del corte del vaso usando 12 mediciones paralelas a las líneas de corte. El CV medio para dos observadores midiendo cada vaso 6 veces en dos ocasiones fue de un 3%. Encontraron una mayor variabilidad entre fotografías tomadas en diferentes momentos. Lo explicaron como consecuencia de cambios en el diámetro de los vasos retinianos en relación con las modificaciones de presión durante el ciclo cardíaco.

**Rassan y cols en 1994** (56), señalaron que se puede obtener una determinación más segura de la anchura de los vasos usando “kick points” en lugar del método de la altura media. Los “kick points” son el primer punto de referencia en la bajada de la pendiente de perfil de transmitancia y perfiles de densitometría y coinciden con los bordes de la columna sanguínea. El calibre de los vasos correspondería a la distancia horizontal entre dos “kick points”. Este método lo utilizaron para medir el calibre de los vasos retinianos en los negativos de las fotografías monocromáticas con luz aneritra (570 nanómetros de longitud

de onda) tomadas al fondo de ojo de 10 voluntarios sanos. La fotografía se realizaba coincidiendo con la diástole cardíaca para lo cual el disparador de la cámara Zeiss se había sincronizado con un electrocardiógrafo para eliminar el efecto de la pulsatilidad sobre la anchura de los vasos durante el ciclo cardíaco. Se analizaron los negativos de tres fotografías del fondo de ojo en cada sujeto, usando un analizador de imágenes digital. La determinación de los calibres se hizo por el método convencional de la mitad de la altura y el método del kick point. El CV fue mejor para el primer método que para el segundo: venas 2,81% y 2,45%; arterias 3,84% y 2,98% respectivamente. La anchura de las venas usando el método del kick point osciló entre 145,16 y 211,16  $\mu$ y el de las arterias entre 107,45 y 161,28  $\mu$

**Stanton y cols en 1995** (57) comunicaron que el IAV se correlacionaba inversamente a la presión sanguínea. Su método consistía en proyectar una diapositiva de fondo de ojo con una magnificación tal que la papila óptica ocupase un círculo de radio de 5 cm, y a continuación se medía el calibre de todas las arterias y venas que cruzasen el borde de un círculo concéntrico a la papila con un radio de 20 cm.

**Wu en 1995** (58) desarrolló un nuevo método para medir la anchura de los vasos retinianos usando análisis computarizado de imágenes aplicándolo a fotografías de fondo de ojo en color tomadas con una cámara Zeiss de fondo de ojo. Usaron el método de detección de bordes publicado por **González y Wintz** para definir los bordes del vaso, obteniéndose mediciones de la anchura media del vaso en un determinado segmento. Encontraron una buena reproducibilidad en sus mediciones realizadas por dos observadores en 20 sujetos normales.

**En 1999 Hubbard y cols** (6) desarrollaron un protocolo de fotografías y evaluaron las anomalías vasculares retinianas en el estudio de riesgo de arterioesclerosis en la comunidad, probando la reproducibilidad de un sistema de graduación de esas anomalías y explorando la posible relación de esos cambios microvasculares con la presión sanguínea. Para ello cuantificaron el estrechamiento arterial generalizado midiendo la anchura de los vasos retinianos

en fotografías digitalizadas de alta resolución. El método resultó ser bastante seguro. Uno de los parámetros analizados en este estudio fue el estrechamiento difuso del árbol arteriolar retiniano y su relación con la HTA. Las fotografías de fondo de ojo obtenidas por cámaras no midriáticas y centradas entre el disco óptico y la mácula se convirtieron a imágenes digitales mediante un escáner de alta definición. Sobre ellas se aplicó una rejilla que divide la retina en una zona A (área comprendida entre el disco óptico y medio diámetro papilar desde el margen del disco) y la zona B (entre medio diámetro papilar del borde del disco óptico y un diámetro entero). La zona de medida es la zona B, donde el observador identifica arterias y venas retinianas (menores de 25 micras se desechan) y marca el borde de los vasos más adecuados. Después se mide el diámetro de todas las arteriolas que cruzan la zona B y se usan las fórmulas desarrolladas por Parr para obtener la medida de sus troncos correspondientes y después combinar pares de troncos de la misma manera hasta que todas las arteriolas sean sumadas bajo el CRAE. A través de la fórmula de Parr también se puede calcular el Equivalente de la Vena Central de la Retina (CRVE). Una vez obtenidos los CRAE y CRVE se calcula el IAV. En este estudio, el IAV oscila entre 0,57 y 1,22 con una media de 0,844, con valores más bajos a medida que aumenta la presión sanguínea. Por cada 10 mm Hg de aumento de presión sanguínea basal el IAV disminuye 0,02 unidades ( $P < 0.001$ )

**En el estudio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) (59)**, las anomalías microvasculares retinianas estaban fuertemente relacionadas no sólo con los niveles de presión sanguínea actual sino también con los pasados. Los datos también sugieren una fuerte asociación con pequeñas apoplejías subclínicas y clínicas. Los resultados de este estudio indican un papel de la microvascularización en la patogénesis de apoplejías clínicas y sugieren la posibilidad de que la fotografía retiniana pueda ser útil clínicamente para identificar gente con riesgo de sufrir accidentes cerebrovasculares.

**En 2003 Knudtson (60)** desarrolla una fórmula para medir un IAV basándose en la fórmula de Hubbard-Parr, pero con ciertas ventajas, como la independencia del número de vasos, de la escala empleada en la imagen y además



es más fácil de implementar. Sabemos que Parr en 1974 desarrolló fórmulas para determinar el calibre arteriolar y en 1999 Hubbard continuó el desarrollo de las mismas para la determinación del calibre venoso. Estas aproximaciones llevaron a buscar la relación entre el calibre arterial y el venoso y al empleo de la fórmula para el cálculo del IAV en diferentes ensayos a partir de fotografías digitales. Esta fórmula es dependiente del número de ramas así como de la escala empleada en la imagen, entre otras desventajas. Por ello se desarrolló la fórmula revisada que sólo emplea los diámetros de las seis arteriolas y vénulas más gruesas que se encuentran entre 0.5 y 1 diámetro papilares medidos a partir del borde del disco óptico. Para compensar la variación entre el número de bifurcaciones en el ojo, la relación entre los troncos y las ramas fue expresada con la siguiente fórmula:

$$\text{Branching Coefficient} = (w_1^2 + w_2^2) / W^2$$

Donde  $w_1$ ,  $w_2$  y  $W$  son respectivamente los anchos de las ramas más estrechas, más anchas y el tronco padre.

A partir de esta fórmula se desarrollaron otras para aproximarse a los vasos equivalentes:

$$\text{Arteriolas: } \hat{W} = 0.88 \times (w_1^2 + w_2^2)^{1/2}$$

$$\text{Vénulas: } \hat{W} = 0.95 \times (w_1^2 + w_2^2)^{1/2}$$

Empleando estas fórmulas en los vasos más gruesos (arteriolas y vénulas) se usa un procedimiento para ir emparejando los vasos más gruesos con los más estrechos, repitiéndolo hasta que se encuentra el equivalente del vaso central. Con la fórmula de Hubbard-Parr revisada evitamos el efecto de la fórmula de Hubbard-Parr clásica que permite que un número variable de diámetros vasculares de cada ojo afecten a la estimación final del calibre vascular. La fórmula clásica incluye términos constantes en sus ecuaciones haciéndolo sensible a la escala empleada, y esto se obvia y mejora en las fórmulas revisadas. En los resultados del IAV con esta fórmula de Hubbard-Parr revisada se observa



que los diámetros arteriulares disminuyen y el venoso aumenta. La correlación entre ambas fórmulas supera el 0,9 tanto en arteriolas como en vénulas.

Vemos, por tanto que existen diversos métodos para determinar el IAV mediante distintas fórmulas, pero no existía ningún estudio que comparase los distintos métodos de medición hasta que **Hemminki en 2007** (61) realizó la comparación de las mediciones y radios arterio-venosos de las distintas fórmulas empleadas para ello. El cálculo del CRAE y del CRVE, a pesar de ser el método de cálculo más extendido en los estudios, resulta algo problemático porque no hay un programa informático que lo haga de modo automático, mientras que los otros métodos se pueden realizar con programas de cálculo usuales. De este modo, Hemminki realiza un estudio con el objetivo de comparar el método Hubbard-Parr con la fórmula de la suma de los diámetros arteriales entre la suma de los radios venosos y con la fórmula del cuadrado de la suma de los diámetros arteriales entre los diámetros venosos; para ello se escogieron los diámetros arteriales y venosos de aquellos puntos donde los vasos cruzaban un círculo que medía un diámetro papilar y otro que medía dos diámetros papilares y se establecieron las mediciones y comparaciones por separado. La mejor correlación que se obtiene es cuando se compara el CRAE/CRVE con la suma del cuadrado del ancho de las arterias entre la suma del cuadrado de la vénulas.

#### **4. MEDICIÓN AUTOMÁTICA DEL IAV**

La red capilar retiniana es un importante ejemplo de microvasculatura que puede ser retratado y estudiado de modo fácil y no invasivo por medio de una simple fotografía de fondo de ojo. El estrechamiento de los vasos sanguíneos retinianos puede ser un indicador precoz del riesgo cardiovascular. Dicho estrechamiento se puede medir gracias al IAV. La medición manual del IAV es un proceso tedioso en el cual los expertos clínicos deben realizar multitud de mediciones de los diámetros de arteriolas y vénulas de diferentes imágenes retinianas, lo cual supone tiempo y esfuerzo por parte de los mismos. Para facilitar el uso del IAV a gran escala en la población general, es necesario desarrollar un método automático preciso y rápido. La mayoría de los métodos empleados para el cálculo del IAV requieren la colaboración por parte de expertos clínicos, generalmente oftalmólogos, que deben decidir, en primer lugar, si el vaso a estudiar es arteria o vena e incluso en algunos casos determinar el diámetro del vaso manualmente. Este proceso no sólo consume mucho tiempo, sino que además, al ser experto-dependiente, está sujeto a las variaciones del individuo que realice la medición e incluso depende del momento en que se realice dicha medición, a pesar de que ésta la haga el mismo sujeto.

Queda claro, por tanto, que es necesario el desarrollo de un nuevo método que realice el IAV de modo automático, rápido y reproducible para que se pueda aplicar en estudios a gran escala o incluso en la práctica clínica diaria.

**Wong et al en 2004** (62) desarrollan un método computarizado de medición del grosor de vasos de modo que, a partir de retinografías del estudio Beaver Dam Eye Study in Wisconsin, los expertos clínicos miden los diámetros de todos los vasos que pasan por una determinada zona de la fotografía. Lo primero que hacen es clasificar los vasos en arteria o vena, posteriormente escogen un segmento determinado del vaso y finalmente el programa informático calcula su diámetro. En este momento el experto debe decidir si el cálculo es correcto o no, en cuyo caso ajustará los bordes del vaso en la imagen para que el diámetro sea correcto. Posteriormente emplean la fórmula de Hubbard-Parr para el cálculo del IAV.

**Li et al** desarrollan en 2005 (63) un método automático para calcular el IAV a partir de dos mediciones, el CRAE y el CRVE. El sistema empleado en este trabajo obliga al experto a realizar un único trabajo manual, el de clasificar el tipo de vaso a estudiar en arteria o vena, y el software empleado elige las zonas de los vasos a medir y realiza la medición. Para este trabajo se escogen 505 segmentos de vasos a partir de 35 retinografías para realizar su medición automática y por otro lado se realiza la medición de modo manual empleando las fórmulas desarrolladas por Hubbard y Parr. Se obtuvo un porcentaje de éxito de un 99,2% en el rastreo de vasos retinianos y la precisión en el cálculo de del IAV fue muy consistente comparada con el cálculo manual realizado por los expertos, con un media de error relativo de un 4,4%.

A pesar de estos adelantos, para el cálculo del índice se seguía requiriendo la participación de expertos clínicos, hasta que en 2007 **Ruggeri et al** (64) desarrollan un método mejorado para el cálculo de IAV automático; para ello se necesita introducir las fotografías de fondo de ojo en el software y se identifica el árbol vascular de modo automático. El nervio óptico precisa ser detectado manualmente y posteriormente se elige un área centrada en el disco óptico que va desde medio diámetro de disco a un diámetro de disco y se divide en cuatro porciones. En cada una de esas porciones se escogerán determinadas detecciones de vasos y se diferenciarán en arteria o vena a partir de las diferentes características de color de cada tipo de vaso; a partir de esas asignaciones mediante estudios de probabilidad se determina para cada vaso su clasificación en arteria o vena. Este método fue realizado en 14 retinografías y se comparó con la medición del IAV manual empleando la fórmula de Hubbard-Parr clásica y la revisada. El índice de correlación de Pearson fue mayor con la fórmula de Hubbard-Parr clásica (0,83) que con la revisada (0,73).

Un año después, en 2008, **Ruggeri** (65) logra mejorar la versión previa en relación a los algoritmos post-procesamiento con el fin de mejorar el reconocimiento de vasos; además, se desarrolla una nueva técnica para la discriminación de los vasos en arteria o vena. En las imágenes de fondo de ojo estudiadas, las arterias presentan un reflejo central claro y visible debido a una

mayor reflectividad de la pared arterial con respecto a la de la vena y los autores se basan en este hecho para realizar la clasificación de los vasos en arteria o vena. Este método de clasificación ya había sido estudiado anteriormente por otros autores y fue evaluado en 20 retinografías donde calculan de modo automático el IAV a partir del CRAE/ CRVE y lo comparan con la estimación manual del mismo índice (el método de Hubbard-Parr clásico) logrando alcanzar una correlación de un 0,88. Una limitación importante de este método es que se necesitan retinografías de alta calidad, debido a que su sistema de clasificación automático se basa en el reflejo central.

**Ortega et al en 2010** (66) elaboran un nuevo modelo para la medición del IAV al que se accede vía web. En esta plataforma, el usuario debe seleccionar el centro del nervio óptico y también debe seleccionar la zona de interés de la retinografía donde se va a realizar la medición. Después de esto, el programa detecta los vasos y los clasifica en arteria o vena para finalmente realizar el IAV. El método de detección automático fue descrito recientemente, y en él se combina una clasificación local basada en el color de los vasos y otro clasificador independiente que distingue el tipo de vaso a lo largo del árbol vascular (67). Con este método los autores obtienen una correlación de 0,856 con dos expertos diferentes en un trabajo con 58 imágenes.

**Muramatsu et al en 2011** (68) proponen otro método automático para medir el IAV y utilizan para ello un modelo de curvas activo para localizar el nervio óptico y posteriormente ubicar la región de interés donde se van a realizar las mediciones. La clasificación automática en arterias o venas se realiza por medio de operadores morfológicos y discriminadores lineales de clasificación. Desarrollan una estrategia para seleccionar los vasos de mayor calibre para el cálculo del IAV. Logran una tasa de errores de 0,11 de media en comparación con los expertos. Aunque esta metodología logra buenos resultados con imágenes de baja resolución, sólo emplea los vasos de mayor tamaño, por lo que no se puede utilizar para la detección del estrechamiento arteriolar.

**Niemeijer et al en 2011** (69) propone otra metodología para la medición del IAV. Primero localizan el nervio óptico analizando la convergencia del árbol vascular. La medición de los vasos se realiza a partir de la segmentación del árbol vascular, en la dirección normal del vaso en ese segmento. Posteriormente se realiza la clasificación automática de los vasos en arteria o vena, se asegura de que el vaso está correctamente clasificado analizando todos los segmentos de un mismo vaso y finalmente realizan la medición del IAV a través de la fórmula de Hubbard- Parr clásica. Con este método obtienen una media de error de 0,06 en 40 imágenes.

Vemos que existen varias aproximaciones que tratan de realizar la medición del IAV de modo totalmente automático, desde la localización del nervio óptico hasta la clasificación de los vasos en arteria o vena, pero el desarrollo de esta metodología es muy complejo debido a la gran heterogeneidad de las imágenes retinianas con respecto al contraste, luz o nitidez de la misma, independientemente de la gran variabilidad inherente a las estructuras vasculares retinianas. Por tanto la metodología automática ideal debería combinar varios procedimientos: una técnica de normalización del contraste, un algoritmo de localización del nervio óptico, un procedimiento de segmentación y medición de los segmentos vasculares y una técnica de clasificación de los vasos en arterias o venas.

## **5-IMPORTANCIA DE LA MEDIDA DEL CALIBRE ARTERIO-VENOSO**

El calibre microvascular retiniano ha sido uno de los parámetros medidos por muchos investigadores de cara a valorar la afectación del árbol vascular retiniano en enfermedades como la HTA y la arterioesclerosis. Cabe destacar que el calibre vascular retiniano se puede alterar en pacientes con enfermedades sistémicas y pacientes sanos, siendo el envejecimiento la causa más frecuente de alteración del calibre vascular. Este hecho ha sido estudiado por múltiples autores; **según Ballantyne, Leishman y Friedenwald** (2,3) las arteriolas retinianas se vuelven más estrechas y rectas con la edad; según **Elwyn** (citado en (23)) éstas se vuelven más anchas y tortuosas; según **Vogelius** (4) más estrechas pero no más tortuosas y según **Wolff** (citado en (23)) más estrechas y tortuosas. Aun así, otros autores no encuentran modificaciones en el calibre vascular retiniano en gente mayor. También es importante tener en cuenta que todas estas descripciones son subjetivas (20, 70, 71).

Muchos investigadores han desarrollado varias clasificaciones de la afectación retiniana producida por la hipertensión arterial y el envejecimiento basadas en la presencia y severidad de las anomalías retinianas entre las que destacan: estrechamiento arteriolar generalizado, anomalías vasculares focales (estrechamiento arteriolar, cruces arteriovenosos, envainamiento vascular, alteraciones en el reflejo parietal), retinopatía hipertensiva (microaneurismas hemorragias intrarretinianas, nódulos algodinosos, exudados duros) y edema del nervio óptico.

En la última década, el número de pacientes con una enfermedad hipertensiva severa ha disminuido considerablemente. Presumiblemente, esto es debido al diagnóstico más precoz de la enfermedad y a la eficacia de los nuevos tratamientos antihipertensivos, evitando así que aparezcan cambios secundarios. La proporción de pacientes con edema de papila y datos de retinopatía hipertensiva avanzada o con manifestaciones clínicas severas como encefalopatía hipertensiva ha bajado y se ven menos casos de fracaso renal terminal o hemorragias intracraneales.

Los médicos especialistas en HTA siempre han destacado la importancia de la exploración del fondo de ojo en el pronóstico y la decisión del tratamiento en un paciente hipertenso. El oftalmólogo requerido para opinar del fondo de ojo en estos casos tiene que enfrentarse frecuentemente a estadios tempranos de afectación retiniana que casi implican solamente al árbol arteriolar con mínimos exudados y hemorragias. Aún así está claro que sigue habiendo mucha confusión a la hora de considerar la existencia de los signos precoces que afectan al calibre arteriolar, tortuosidad, enderezamiento y cruces arterio-venosos.

**Wagener** (citado en (23)) considera que los cambios iniciales en las arteriolas retinianas en la hipertensión son el estrechamiento y la acentuación del reflejo del hilo arteriolar. **Gowers en 1876** (citado en (23)) ya estableció que el estrechamiento de las arterias es el primer cambio que se produce en el fondo de ojo de un paciente con hipertensión arterial. **Shelburne** (5) incluye una constricción generalizada con una constricción segmentaria de las arteriolas y algún signo de cruce en la tríada de las lesiones arteriolas peculiares de la enfermedad hipertensiva. Esta tríada se puede encontrar en personas de edad avanzada.

**Ballantyne** (citado en (23)) establece que el estrechamiento y la tortuosidad de las arteriolas puede ser un signo precoz de hipertensión, pero **Leishman** (3) describe estos cambios como un fenómeno tardío debido a la arterioesclerosis.

**Crick** (citado en (23)) mantiene que en pacientes jóvenes (menores de 55 años) la hipertensión se asocia con vasos tortuosos y sensibles al espasmo que después tienden a ser estrechos y rectos.

**Frishberg** (citado en (23)) establece que el aumento de la tortuosidad de las arteriolas es una manifestación frecuente de la arterioesclerosis hipertensiva, pero muchos vasos sanos pueden verse también tortuosos. En su experiencia es raro que las arteriolas retinianas no se estrechen en las hipertensiones pronunciadas sobre todo en pacientes jóvenes.

**Boyd y Margerie** (44) encontraron leves tendencias a la disminución del calibre arteriolar con el envejecimiento y una mayor tendencia a la disminución ante aumentos de la presión arterial especialmente en sujetos jóvenes. A pesar de esto existe mucha variabilidad y solapamiento en todos los grupos de edad y niveles de presión sanguínea, lo que hizo considerar que esos cambios tienen poca relevancia clínica. **Hubbard y cols en 1999** (6) desarrollan un método de evaluación de las anomalías microvasculares asociadas a HTA y/o arterioesclerosis, mediante el cual realizan un estudio comunitario en una muestra de alrededor 11. 000 pacientes, llegando a la conclusión de que el descenso del IAV se puede relacionar con la presión arterial. Por cada 10 mmHg de aumento en la presión arterial, el IAV disminuye en 0,02 unidades (p 0,0001).

Es evidente que existe mucha confusión entre opiniones, pero probablemente la mayoría de los autores consideran el estrechamiento de las arteriolas retinianas como una importante manifestación precoz de la hipertensión. Un método objetivo y eficaz para calcular el calibre vascular, y relacionar su posible estrechamiento con la hipertensión arterial puede ser interesante de cara al pronóstico y la decisión terapéutica de los casos de vasoespasmo retiniano debido a una subida de tensión arterial aguda, antes de que aparezca la afectación retiniana. También sería útil para predecir la evolución de la afectación del árbol vascular humano en el caso de un estrechamiento vascular secundario a una hipertensión arterial crónica y para monitorizar la respuesta terapéutica a diferentes fármacos.





# Material y método

---



## **1. GRUPOS MUESTRALES**

Se han desarrollado cuatro experimentos con diferentes grupos muestrales con el fin de lograr la validación de un nuevo método de medición del IAV.

Para **el experimento 1** se eligió una muestra poblacional constituida por 12 personas voluntarias sin enfermedades conocidas, con edades comprendidas entre los 30 y los 60 años de edad. Todos los pacientes tenían medios transparentes en ambos ojos, defecto refractivo inferior a 2 dioptrías y no presentaban enfermedad sistémica asociada conocida (DM, HTA o dislipemia)

**Para los otros tres experimentos** se tomó otra muestra poblacional: Se escogieron 268 ojos de 141 pacientes hipertensos que acudían al servicio de oftalmología para evaluar el fondo de ojo desde los servicios de medicina interna del Hospital Provincial de Conxo y del Hospital de Barbanza. Los criterios para clasificar a un sujeto como hipertenso se basaron en la presencia de cifras de presión arterial sistólica y presión arterial diastólica superiores a 140/90 siguiendo los procedimientos del Comité Nacional Americano de la HTA (72).

Los sujetos fueron estudiados basalmente y después de seis meses de la administración de un bloqueante del receptor de la angiotensina II (ARA II), fármaco que inhibe los efectos vasoconstrictores y secretores de aldosterona y de angiotensina II mediante el bloqueo selectivo de los receptores de la angiotensina II que se encuentran en tejidos como el músculo liso vascular y la glándula suprarrenal, y de ese modo disminuyen la resistencia vascular periférica. A los pacientes que estaban siendo tratados con otro antihipertensivo se les realizó un período de lavado de cuatro semanas antes de instaurar el nuevo tratamiento.

La edad de los sujetos varió entre 30 y 80 años (media de  $60 \pm 11$  años), 70 de ellos eran mujeres y 71 hombres, en todos los casos los participantes tenían medios transparentes, defecto refractivo inferior a 3 dioptrías de hipermetropía,

miopía o astigmatismo y no habían sido sometidos a cirugía ocular previa; fueron excluidos aquellos pacientes con enfermedades sistémicas que pudieran interferir en los resultados, así como aquellos que libremente y una vez informados no quisieron intervenir en el estudio.

Una vez explicados los objetivos y firmado el consentimiento informado, se dilata la pupila mediante la instilación de dos gotas de tropicamida y dos gotas de fenilefrina. Al cabo de 20-30 minutos se toma una fotografía de fondo de ojo de ambos ojos de cada participante, en 50 grados y en color, centrada en la papila. Se utilizó la cámara de fondo de ojo Topcon R TRC 50 IX.



## **2. DESARROLLO DE UN PROGRAMA INFORMÁTICO:**

Una vez obtenidas las retinografías centradas en la papila, éstas deben ser introducidas en una aplicación informática vía web denominada SIRIUS (66) con el fin de realizar la medición del ancho de los vasos y, finalmente, a partir de estas mediciones determinar el IAV. Este programa, al acceder a él vía web, se puede utilizar por distintos usuarios desde distintos ordenadores de diferentes localizaciones e instituciones y desde diferentes plataformas de trabajo (Windows, Linnux, Mac).

La aplicación web tiene un servidor, por lo que tanto los datos como el software están centralizados en una localización. El usuario solicita información al servidor web y recibe datos a través de un buscador web. Esto conlleva dos beneficios, por un lado los usuarios pueden acceder a la aplicación web desde cualquier aplicación vía internet y, por otro lado, los usuarios no necesitan instalar un software específico para obtener los servicios de la aplicación web (Fig. 1).

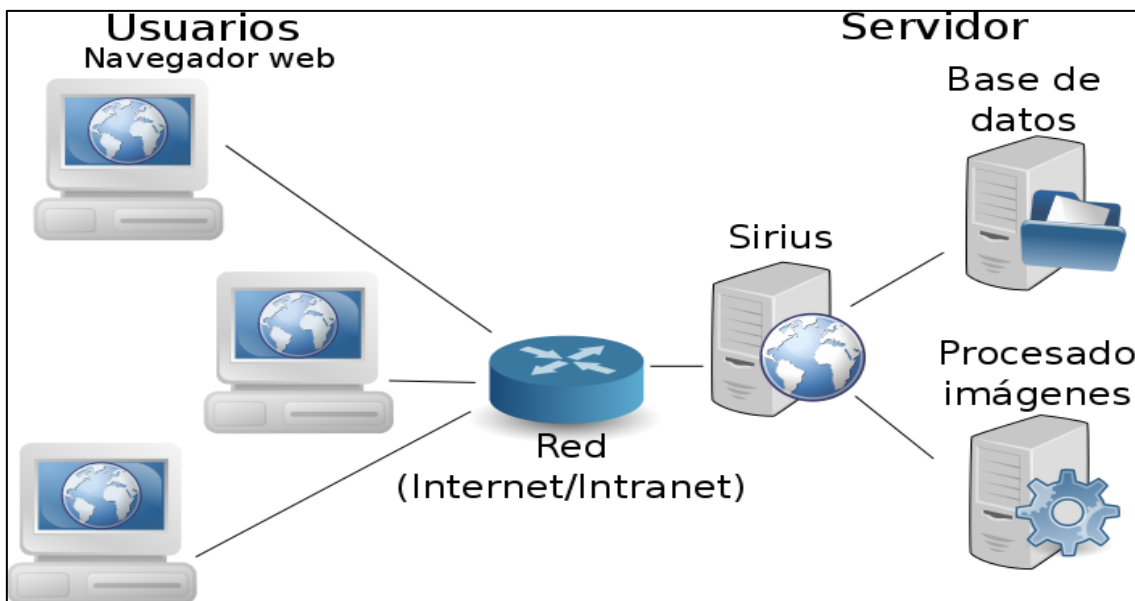
Este sistema se subdivide en cuatro ramas para garantizar la independencia del usuario. Cada rama tiene un propósito específico:

1ª rama: es la del acceso a los datos. Se trata de una base de datos en los que éstos pueden ser recuperados y pasados a la aplicación.

2ª rama: es la de acceso a la aplicación. El servidor ejecuta el programa pedido y envía los resultados a la rama de presentación.

3ª rama: es la de presentación en la que los datos se transforman de modo que sean comprensibles para el usuario.

4ª rama: es la del usuario donde se visualizan los resultados.



**Figura 1:** Esquema general del funcionamiento de Sirius. Diferentes centros Hospitalarios pueden introducir imágenes en la aplicación y a su vez la información resultante del procesamiento de imágenes puede ser vista por diferentes usuarios a través de internet.

En términos de funcionalidad, la plataforma SIRIUS emplea un módulo para el manejo de los usuarios. Este módulo restringe el acceso al sistema solamente a los usuarios certificados y define dos roles para los mismos, el de administrador y el de usuario normal. Los administradores pueden registrar nuevos usuarios o modificar detalles de los usuarios normales. Los usuarios normales sólo pueden trabajar con las imágenes.

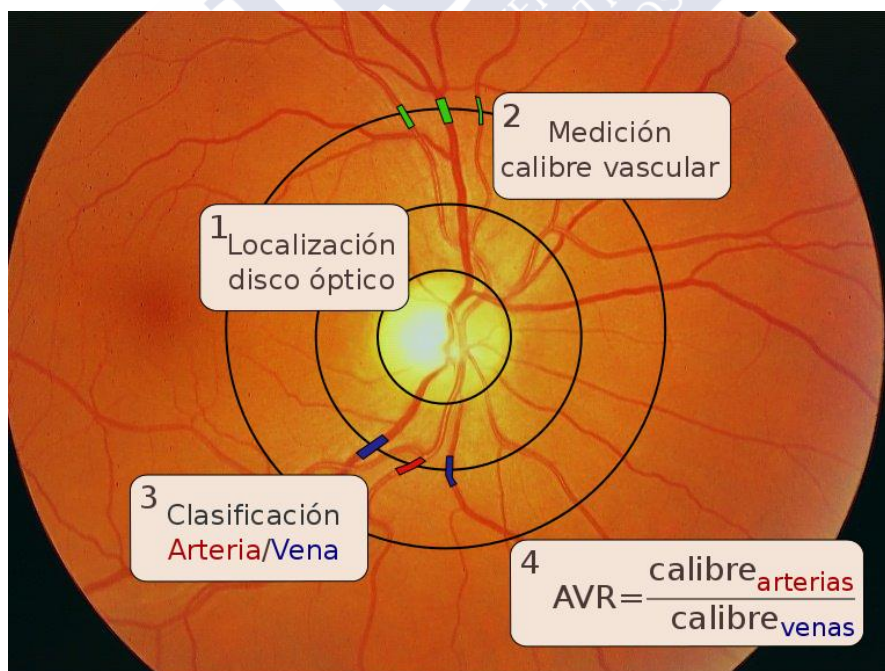
El uso de una web para trabajar en las diferentes tareas requeridas presenta importantes ventajas. Por un lado los médicos sólo necesitan un navegador web para usar la aplicación. Cualquier mejora en el software tiene lugar en la zona del servidor de modo que los usuarios no necesitan actualizar programas en sus ordenadores. Por otro lado, puede accederse al sistema desde cualquier localización.

Otro asunto importante es el de la privacidad y seguridad, ya que este tema es vital cuando se manejan datos clínicos. En este sentido, el protocolo de seguridad http proporciona una codificación de los datos y crea un canal de seguridad sobre internet.

### **3. MEDICIÓN DEL IAV:**

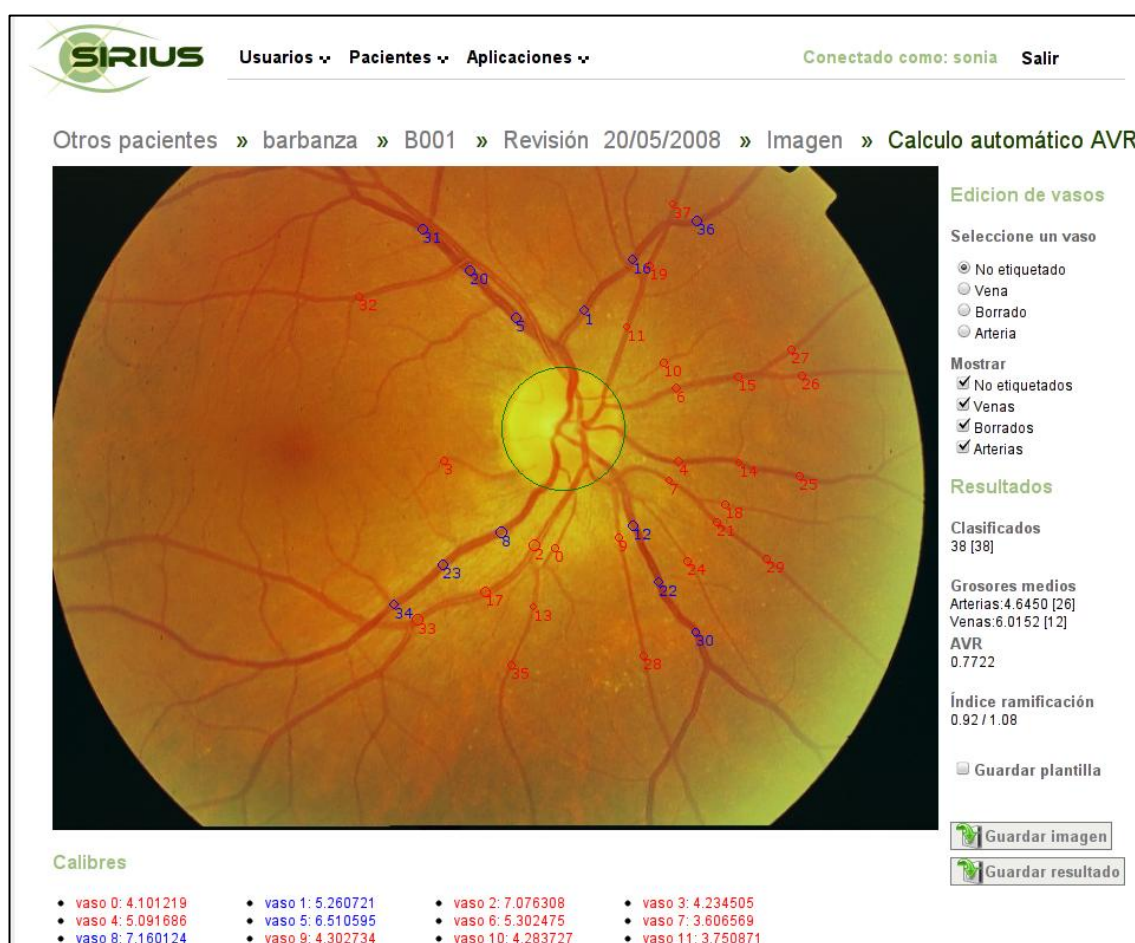
Para la medición del IAV se deben seguir unos pasos ordenados, una vez que tenemos la imagen de la retina centrada en la papila introducida en el programa informático SIRIUS (Fig. 2).

- 1- Localización del nervio óptico para la obtención de la región de interés de la retinografía en donde vamos a realizar las mediciones.
- 2- Selección de los radios de interés
- 3- Extracción de los vasos para localizar las zonas en donde vamos a realizar las mediciones.
- 4- Medición del ancho o diámetro de los vasos.
- 5- Clasificación del vaso en vena o arteria.
- 6- Determinación del IAV.



**Figura 2:** Pasos a seguir para lograr el cálculo de IAV

El programa permite dos opciones de determinación del IAV, el modo manual y el modo automático y ambos tienen en común que el programa realiza, sin intervención del usuario, la extracción de los vasos que se van a medir, la medición del ancho de los vasos y el cálculo del IAV (Fig. 3 ). Empleando el método manual, el experto debe seleccionar los bordes de la papila y los radios de interés en los que se van a realizar las mediciones, finalmente deberá clasificar los vasos en arteria o vena; mientras que con el modo automático todos estos pasos los realiza la aplicación sin intervención del usuario.



**Figura 3:** Imagen capturada de Sirius. Éste es el paso final del programa en donde obtenemos los segmentos vasculares que se van a medir, la clasificación en arteria (en rojo) o en vena (en azul), el calibre de los vasos (en la parte inferior de la imagen) y finalmente la medición del IAV o AVR ( en inglés Arterio Venous Ratio).



### 3.a. Método manual

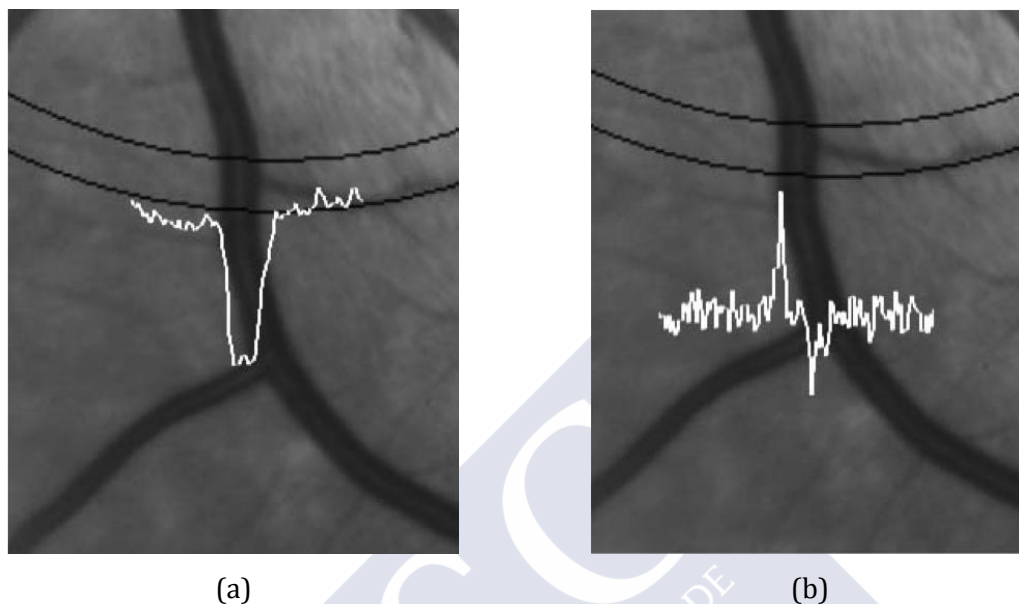
En la determinación manual del IAV el usuario debe localizar manualmente el perímetro del nervio óptico y a continuación se realizan círculos concéntricos al mismo y múltiplos de su diámetro.

Las regiones de interés son precisamente los segmentos en los que el vaso se corta con dichas circunferencias, ya que es ahí donde se va a realizar la medición del ancho del vaso.

El usuario deberá escoger aquellos segmentos que le parezcan adecuados, eliminando por ejemplo, aquéllos que sobreestimen o infraestimen el ancho del vaso, aquellos vasos demasiado gruesos o finos, zonas de cruce arteriovenoso o bifurcaciones, y en general, todos aquellos segmentos en los que la medición del calibre vascular no sea adecuada. El usuario también debe clasificar el vaso en arteria o vena según su criterio.

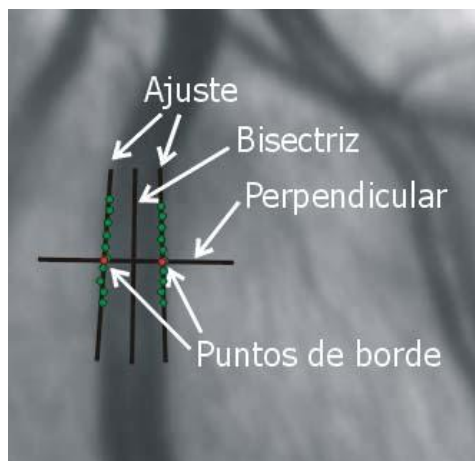
Para la extracción de los vasos y medición del ancho de los mismos había sido validado previamente el **método lineal** (21-23) en el que el programa informático denominado ART-VENA, a partir de retinografías centradas en el disco óptico determinan en IAV de modo manual; en una primera etapa se realiza la detección de bordes en coordenadas polares. Para ello se toman como datos de entrada un conjunto de varias secuencias de niveles de gris, correspondientes a píxeles localizados sobre circunferencias centradas en el nervio óptico, de radios muy próximos (Fig. 4a). Como resultado de aplicar un filtrado en la dirección de la coordenada angular, se obtienen un nuevo conjunto de secuencias que representan una estimación de la derivada respecto al ángulo para cada píxel (Fig. 4b). Sobre estas secuencias se efectúa la detección de bordes, aplicando, en este orden, una umbralización del valor de la derivada, una detección de extremos de la misma y una interpolación cuadrática en una vecindad en cada extremo. El borde se fija en el extremo de la parábola resultante de la interpolación. Finalmente se considera que se ha detectado un vaso sanguíneo siempre y cuando se halle un mínimo y un

máximo de la derivada y no al revés, pues los niveles de gris del fondo de ojo presentan valores mayores que los del interior de los vasos.



**Figura 4:** (a) Perfil del nivel de gris sobre una circunferencia centrada en el nervio óptico; (b) derivada de primer orden del perfil de la Figura 4 a.

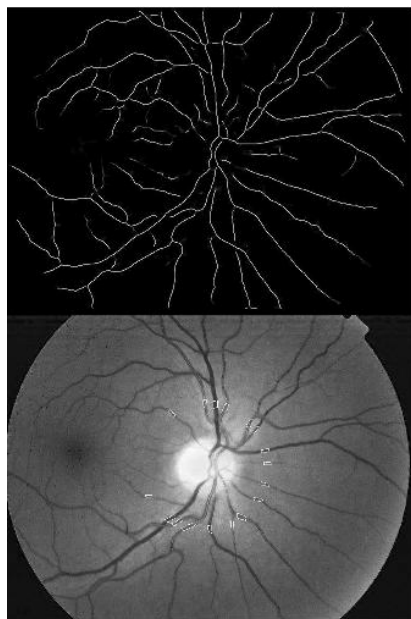
Una vez realizado el análisis unidimensional, se pasa a la fase de búsqueda de correspondencia entre los vasos detectados en las distintas secuencias, que ofrece como resultado un conjunto de pares de puntos, asociados a las dos paredes vasculares. Las correspondencias se determinan por proximidad en el espacio de coordenadas polares del punto medio entre los dos bordes. Todos aquellos vasos que obtengan un número reducido de correspondencias se desecharán en el análisis final. Con los datos obtenidos se realiza una aproximación lineal a la forma de los bordes de cada vaso, puesto que el número de secuencias suele ser tal que un solo segmento muy corto es barrido en el análisis, por lo que se puede considerar lineal. De este modo, y tras la eliminación de los puntos del borde que se desvían demasiado de la recta, se obtienen las dos rectas que delimitan cada vaso. En general, estas dos rectas no son paralelas, por lo cual la distancia entre ambas se calcula sobre la recta perpendicular a la bisectriz que pasa por el punto de radio intermedio situado en el centro del vaso (Fig. 5).



**Figura 5:** Cálculo del grosor de un vaso determinado mediante el método lineal

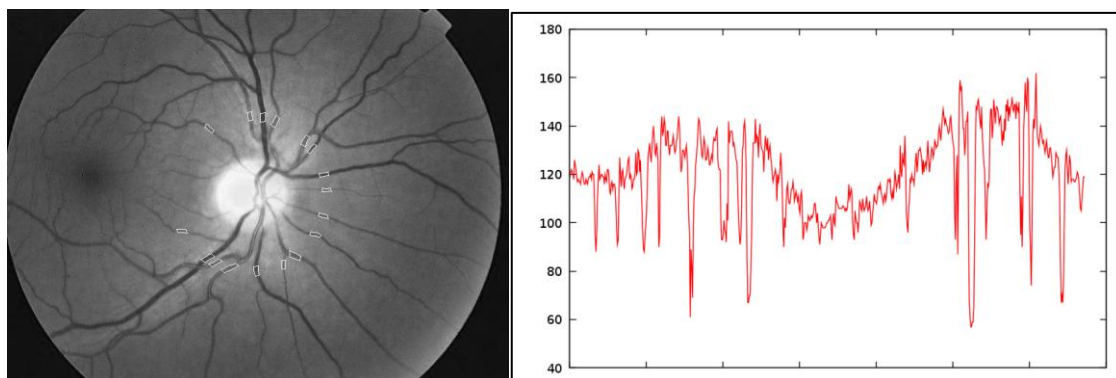
El **método de Snake (24,74-77)** desarrollado posteriormente, se adapta mejor a la forma real del vaso, ya que éste no es rectilíneo sino sinuoso como el trayecto de una serpiente, de ahí su nombre. El modelo de detección de vasos se basa principalmente en una extracción de crestas y un seguimiento de los vasos. Una cresta puede definirse como una zona continua de puntos que da forma a los valores más altos o más bajos de intensidad de la imagen en su entorno. De esta manera, si se interpreta la imagen como un paisaje con volumen en función de la intensidad, los vasos pueden considerarse crestas o valles, es decir, regiones que forman un nivel tubular y extremo (máximo o mínimo) en su entorno. Esto significa que se pueden localizar los vasos en el radio de posición de análisis si se usa la posición de las crestas.

La imagen de las crestas pueden obtenerse mediante el operador curvatura extrínseca de los conjuntos de nivel basada en tensor estructural (MLSEC-ST)(78). El tensor estructural se usa para filtrar imágenes basadas en una serie de parámetros. En el estudio de **López et al (78)** se presenta una aproximación robusta para ajustar todos los parámetros y obtener resultados de alta calidad en todo tipo de imágenes. Los puntos de la imagen candidatos a ser vasos vendrán dados por la intersección entre cada cresta y el análisis de la circunferencia (Fig. 6). Para descartar que se trate de ruido en lugar de un vaso auténtico se aplica un seguimiento del vaso en la región de interés, se usan circunferencias concéntricas y se fuerza a que los vasos aparezcan un número mínimo de veces en ellos.



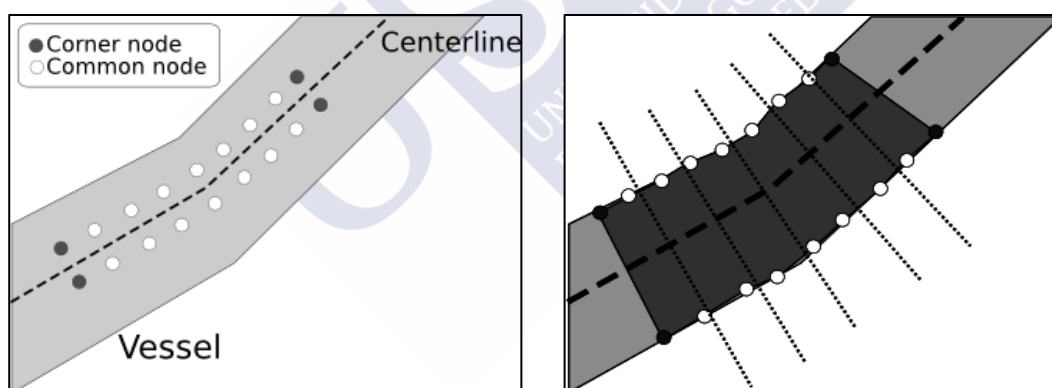
**Figura 6:** Segmentación de los vasos. La imagen superior representa los centros de los vasos. La imagen de abajo muestra la segmentación de los vasos en la circunferencia de interés

La detección de las regiones de interés, es decir, los puntos en los que la circunferencia corta los bordes del vaso, es otro paso importante y lo realiza el programa automáticamente. En esos puntos es donde se medirá el grosor de los vasos. Para ello simplemente hay que basarse en el hecho de que los vasos son más oscuros que el resto del parénquima retiniano, por lo que, tras emplear un filtro *Green channel* que sirve para uniformizar el contraste tanto inter-imágenes como intra-imágenes, se analizan los píxeles de cada circunferencia y los picos más bajos son las intersecciones (Fig. 7).



**Figura 7:** Detección de los puntos de interés. A la derecha observamos el filtro verde y a la izquierda observamos los picos más bajos de eje Y que se corresponden con las intersecciones de la circunferencia.

La zona de intersección entre el vaso y la circunferencia simula una serpiente a la que denominaremos *snake*. Un *snake* o contorno activo se define como una superficie poligonal que evoluciona en la imagen hasta que alcanza los bordes de un objeto de interés. Su forma es modelada por energías y se estabiliza una vez que su función de energía es mínima, lo que ocurre al alcanzar un objeto de interés. La inicialización del *snake* es un aspecto muy importante para obtener un resultado final válido. Cada *snake* tiene en su interior una serie de puntos que lo cruzan en toda su longitud, tanto en el centro de la misma como en sus bordes y se colocan según donde se sitúe la energía interna o externa del *snake*. La energía interna conlleva suavidad y continuidad mientras que la energía externa coloca los puntos en los extremos de los vasos. Vemos por tanto como existen dos tipos de puntos: los centrales y los de borde. Los puntos de borde no tienen energía interna y así pueden detectar discontinuidades. Después se realiza un ajuste topológico para evitar localizaciones erróneas de bordes de vasos (Fig. 8).



**Figura 8:** *snakes* como resultado de la segmentación de los vasos. Imagen de la izquierda: los puntos o nodos son localizados inicialmente a ambos lados del centro de los vasos y siguen la dirección del mismo. Imagen de la derecha: Una vez que el *snake* se ajusta a los bordes del vaso, el ancho del mismo se mide en diferentes puntos a lo largo del segmento para asegurar su correcta medición

Así podemos detectar la dirección real del vaso y, por otro lado, los bordes del vaso en ese segmento son medidos en múltiples puntos, siendo el resultado final la suma de los anchos de todas estas mediciones. De este modo obtenemos una medición del grosor del vaso más fiel a la realidad, ya que por un lado realizamos múltiples mediciones y por otro lado seguimos la dirección real del

vaso. El último paso es realizar ajustes topológicos para evitar localizaciones erróneas de los bordes de los vasos o incluso detección de puntos donde no existen vasos.

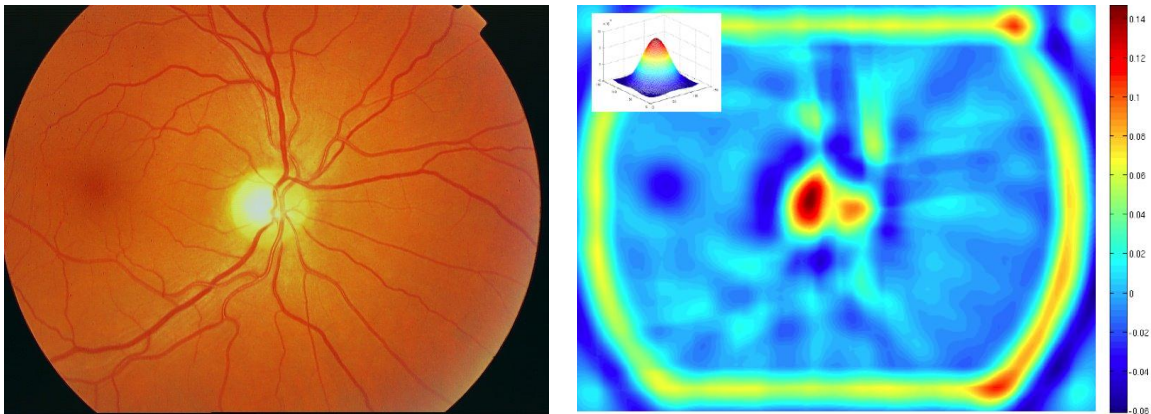
### **3.b. Método automático de medición del IAV:**

La medición manual de IAV se realiza midiendo el ancho de los vasos en diferentes circunferencias centradas en el nervio óptico, como ya hemos comentado anteriormente. Esto parece sencillo, pero consume mucho tiempo, es subjetivo y difícilmente reproducible. Por este motivo, se ha trabajado para lograr desarrollar un método de medición automático con el que se obtengan unas medidas exactas y reproducibles (74-77).

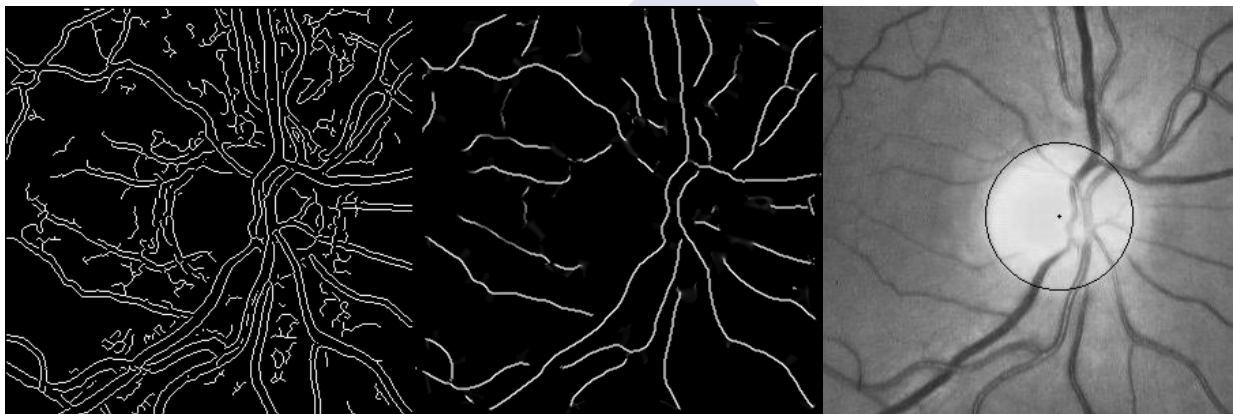
El método automático incluye varios pasos. El primero es la localización automática del nervio óptico y este punto es muy importante ya que el ancho de los vasos debe ser medido en puntos equidistantes desde el centro del árbol vascular que es precisamente el nervio óptico. Se localiza en primer lugar la región de interés donde puede estar localizado el nervio óptico y para ello se emplea un detector de manchas, el método de diferencia de Gaussianas (DoG) (Fig. 9).

El operador DoG se basa en el filtrado de imágenes con dos tipos de filtros Gaussianos a diferentes escalas, extrayendo ambas imágenes. Los filtros Gaussianos tienen forma circular por lo que resaltan aquellas partes de la imagen en donde hay formas circulares, como el disco óptico. De este modo, se ajustan para aproximar el tamaño exacto del disco óptico. Un vez que se detecta el nervio óptico se acota la zona de interés donde se va a realizar la medición del IAV. A continuación se debe realizar un ajuste más fino para detectar los bordes exactos del nervio óptico y de los vasos, para ello se emplea la transformada de Hough y un detector de bordes Sobel o Canny, de este modo obtenemos los bordes del nervio y de los vasos. A través del MLSEC operator se obtienen crestas que localizan los vasos. De este modo, uniendo ambas imágenes obtenemos los bordes del nervio que son aquellos puntos que detecta *Sobel* pero que no pertenecen a una cresta (vaso) (Fig. 10).





**Figura 9:** Detección de la región de interés a través del método de detección de manchas. A la izquierda se observa la imagen sin la aplicación del filtro y a la derecha se aprecia la misma imagen tras la aplicación del filtro.



**Figura 10:** Método de localización del disco óptico empleando la transformada de Hough.

Una vez obtenido el perímetro del vaso, el programa realiza de modo automático varias circunferencias concéntricas cuyo radio es múltiplo del radio del disco óptico. La detección de los puntos en los que la circunferencia corta los bordes del vaso y la segmentación de los vasos en los puntos de corte y la posterior medición de los bordes del vaso mediante el método *Snake* ya han sido explicados anteriormente. En ocasiones se producen errores en la medición del ancho de los vasos debido a ruido de fondo, reflejos o cambios de luz en la imagen; también hay que desechar aquellas mediciones realizadas en las bifurcaciones o en los puntos de cruce arteriovenosos. Existen algoritmos para evitar estos errores de medición, entre ellos la detección de las bifurcaciones y cruces arteriovenosos en la imagen para poder desecharlos posteriormente. También se pueden eliminar vasos de

muy pequeño calibre, aquellos vasos que sobre o infra-estimen la anchura real de los mismos o detecciones erróneas donde no existen vasos.

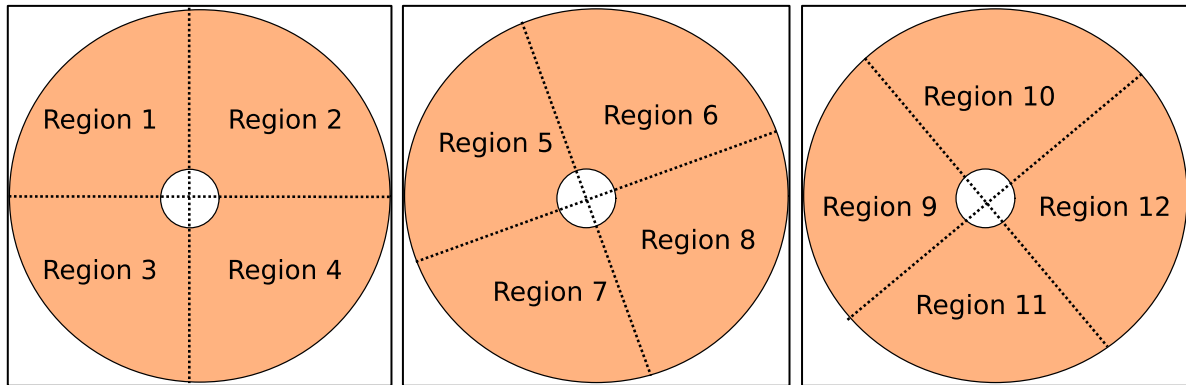
Para el cálculo automático del IAV, un paso importante es la clasificación en arteria o vena. Para la clasificación, el programa se basa en que las arterias son más claras que las venas en las imágenes de blanco y negro, de modo que el color puede emplearse como un criterio de clasificación. De todos modos, las imágenes obtenidas tienen diferente luminosidad y contraste aunque hayan sido obtenidas desde un mismo retinógrafo. Es más, la luminosidad y contraste no es constante en cada imagen. Por estos motivos se le aplican a las imágenes unos filtros *The Multi Scale Retinex* con el fin de homogeneizar la luminosidad de las mismas (Fig. 11).



**Figura 11:** Normalización de la luminosidad y contraste basada en la técnica *Multi Scale Retinex technique*.

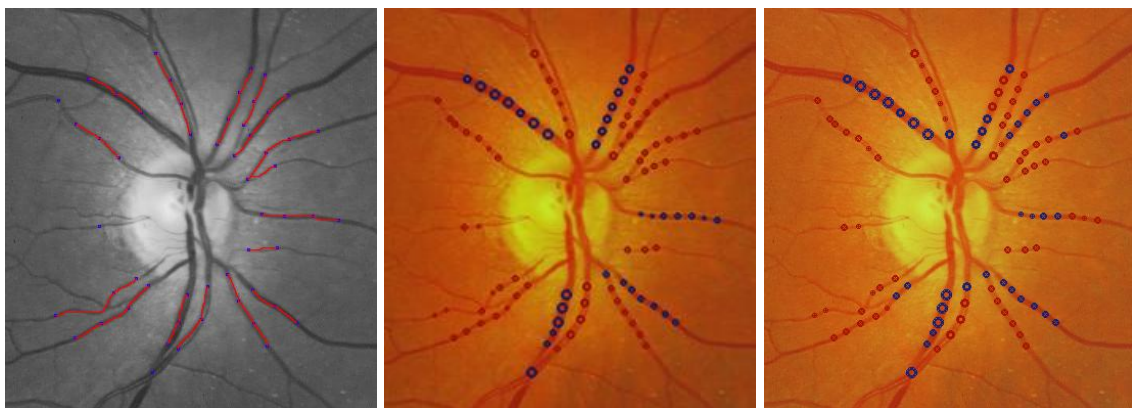
Otro modo de clasificación adicional que se ha utilizado consiste en dividir la región de interés de la retinografía en cuatro regiones centradas en el nervio óptico. Los segmentos que se encuentran en cada región se clasifican en arterias o venas de modo independiente. A continuación, se va rotando la imagen de modo que se pueden escoger diferentes regiones, todas ellas centradas en el nervio óptico y se clasifican los vasos escogidos en todas ellas. De este modo cada segmento es clasificado como arteria o vena varias veces y cada vez con vasos vecinos diferentes. La clasificación final del vaso es el resultado de la coincidencia de las diferentes clasificaciones (Fig. 12).





**Figura 12:** Clasificación local de los vasos. Se definen cuatro segmentos centrados en el disco óptico y se realiza la clasificación. Posteriormente se definen otras regiones que se solapan con la primera y se realiza la clasificación de modo independiente en cada una de ellas.

Hasta este momento la clasificación de los vasos como arteria o vena se ha realizado en base al color de los vasos. Los puntos se escogen en distintas circunferencias a lo largo del vaso de modo que pueden conectarse con el fin de asegurarse su correcta clasificación. Para ello se necesita un algoritmo que rastree los vasos retinianos. Este algoritmo se basa en la teoría del camino más corto. El objetivo de esta teoría es el de encontrar el camino más corto entre dos puntos de un modo consistente y eficiente. Así logramos conectar los vasos a través del centro de los mismos en los diferentes segmentos vasculares y en las distintas circunferencias. La clasificación final del vaso será el tipo de vaso clasificado de modo más repetido (Fig. 13).



**Figura 13:** clasificación de los vasos en arterias y venas por medio de la conexión de distintas circunferencias.

Para lograr el cálculo del IAV de modo automático fue necesaria la implementación de un paso más: la selección de los segmentos vasculares adecuados. Para lograrlo se tomo como base el modo que tienen los expertos de seleccionar los segmentos (74). Se escogieron 86 imágenes que fueron analizadas por dos expertos logrando correlaciones altas entre ellos y coincidiendo en las reglas para la elección de los vasos:

- Se eliminan aquellos vasos que sobre o infra estimen el calibre vascular

- No se tienen en cuenta los segmentos vasculares en cruces arteriovenosos o en bifurcaciones vasculares

- Tampoco se tienen en cuenta vasos finos, por dos razones: es más difícil saber qué tipo de vaso es y es más difícil conocer el diámetro exacto sin errores.

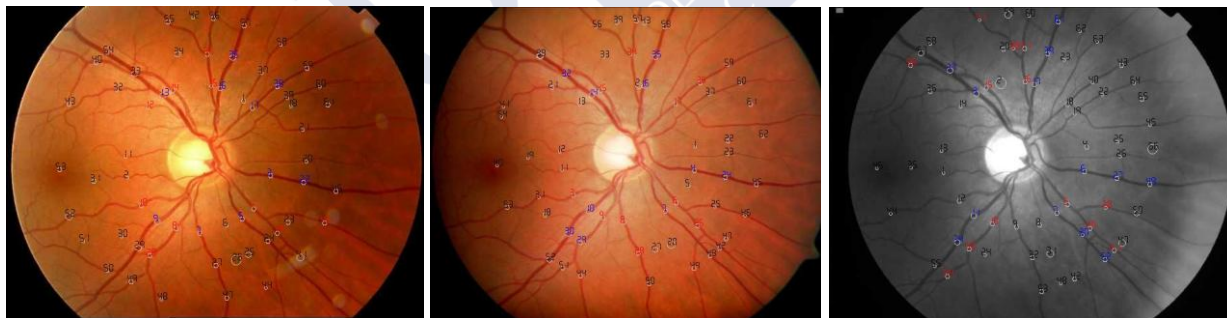
Para lograr la primera hipótesis sólo se debe utilizar el rastreo a través del vaso, descartando aquellos segmentos en los que el grosor del vaso mide el doble o la mitad de la media de grosores de los segmentos a lo largo del vaso. Esos valores extremos también pueden ser detectados a través de percentiles, descartando aquellos segmentos cuyos grosores sean menores que el  $p$  percentil o mayores que el  $100-p$  percentil. La segunda hipótesis necesita un algoritmo que detecte cruces o ramificaciones en el árbol vascular. En el caso de la tercera hipótesis se obtienen buenos resultados con las arterias y venas que posean un diámetro menor que el percentil 10 detectado para cada clase.

Así, la conjunción de todas estas reglas ha permitido obtener un método automático y objetivo que consiga medir el IAV empleando la fórmula basada en el cociente entre la media de las arterias y la media de las venas.

#### **4. DISEÑO DEL ESTUDIO:**

**Experimento 1** consiste en comparar las mediciones del IAV retiniano a partir de fotografías de fondo de ojo realizadas con cuatro retinógrafos diferentes. Dos expertos midieron el calibre vascular retiniano en 24 ojos de 12 voluntarios de modo independiente. Se tomaron 6 fotografías de fondo de ojo por cada paciente, todas en 50 grados y centradas en la papila, y se emplearon para ello 4 retinógrafos diferentes: Topcon TRC 50 IX (Topcon America Corp, Paramus, NJ), Topcon TRC-NW6S (Topcon, Tokio, Japan), Zeiss FF450 Plus IR COM Visupac 451 (Carl Zeiss Meditech AG, Jena, Germany), and Zeiss Visucam (Carl Zeiss Meditech AG, Jena, Germany). Se dilataron las pupilas de los voluntarios previamente con tropicamida y fenilefrina para la realización de todas la retinografías, excepto cuando se empleó la cámara Topcon TRC-NW6S.

Con las cámaras Topcon TRC 50 IX y Zeiss FF450 Plus IR COM Visupac 451 se tomaron de manera adicional fotografías en aneritra de los dos ojos de cada paciente, además de las tradicionales en color. (Fig. 14).



**Figura 14:** Fotografías de un mismo fondo de ojo tomadas por diferentes retinógrafos: Topcon TRC 50 IX, Zeiss FF450 Plus IR Visupac 451 y Topcon TRC 50 IX Aneritra. Los números que aparecen en los vasos son segmentos vasculares que se detectan a través del programa manual para posteriormente realizar la medición de la anchura de los mismos. A continuación, el investigador clasifica el vaso como arteria (en rojo) o vena (en azul) y finalmente el programa realiza el cálculo del IAV.

**Experimento 2:** Se pretende validar un nuevo método de medición del calibre vascular basado en *snakes*, comparándolo con el método lineal ya validado anteriormente (21-23). También se estudia la variabilidad debida a distintos observadores (variabilidad interobservador) y para ello se evalúan de forma independiente las mismas imágenes por dos observadores diferentes. Por último se compara el calibre vascular retiniano antes de comenzar el tratamiento antihipertensivo y seis meses después de la instauración del mismo. El objetivo de este experimento es doble, por un lado validar el método de medición manual mediante *snakes* y por otro lado comprobar si hay variaciones en el calibre vascular tras la instauración de un tratamiento antihipertensivo concreto en pacientes hipertensos.

**Experimento 3:** Se compara el método de medición basado en el cociente de medias con el método clásico de medición Hubbard-Parr (48, 49, 73) y el método Hubbard-Parr Revisado o Método Knudtson (60).

**Experimento 4:** Se compara el método manual basado en *snakes* con un nuevo método de medición del IAV totalmente automático en base a la comparación entre la detección manual de arterias y venas y la detección de las mismas realizada por la aplicación de modo automático. Este experimento se realiza en 125 fotos de pacientes hipertensos escogidas al azar de entre los 141 pacientes incluidos en el estudio, todas en período basal.

Las retinografías obtenidas presentan imperfecciones de distintos tipos como desenfoque, cambios en la luminosidad, descentrado de la papila, borrosidad por alteración en la transparencia de medios, características que podemos encontrar en las retinografías que se realizan en la consulta diaria a pacientes y , siempre que posean unos mínimos criterios de calidad, la medición del IAV no se ve afectada por ello ya que los valores obtenidos siguen siendo fiables y reproducibles. (Fig 15).





**Figura 15:** Ejemplos de retinografías de pacientes incluidos en el trabajo a las que se le midió el IAV. Se observan diferentes niveles de luminosidad, desenfoque y centrado de la papila, en todas obtuvimos mediciones del ancho de los vasos y del IAV fiables y reproducibles

## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS® Statistics 17. 0 (SPSS Inc. , Chicago, IL, USA) y el software estadístico R 2. 14. 1 (R Development Core Team, 2011). El cálculo de las medidas de consistencia se realizó mediante el paquete *irr* en R. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un p valor <0,05.

A continuación explicamos con detalle el análisis estadístico de cada experimento por separado:

### **EXPERIMENTO 1**

El análisis de las mediciones mediante el índice lineal con los diferentes retinógrafos y observadores se llevó a cabo mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Se trata de un diseño de dos factores, ambos con medidas repetidas, en el que las unidades de análisis (ojos) que participaron en el estudio pasaron por todas las condiciones definidas por las posibles combinaciones entre los niveles de ambos factores (retinógrafo y observador). En la comparación de los efectos principales, para controlar la tasa de error o probabilidad de cometer errores de tipo I en comparaciones múltiples, se utilizó la corrección de Bonferroni. Para la comprobación de la validez de la hipótesis de normalidad se empleó el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

Se midió el grado de correlación lineal (mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson) y el grado de acuerdo entre los diferentes retinógrafos y observadores. El grado de acuerdo se llevó a cabo mediante el análisis de Bland-Altman (79, 80) y se calcularon medidas de consistencia/acuerdo o validez como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff (81) (especialmente útil cuando el nivel de medida de los datos es más elevado que nominal u ordinal) o la media de las correlaciones bivariantes.

## EXPERIMENTO 2

El análisis de las mediciones del IAV en las fotografías de fondo de ojo realizadas en un mismo retinógrafo con los diferentes índices, el índice lineal y el índice *Snake*, distintos observadores e instantes temporales de medición (instante basal y a los 6 meses), se llevó a cabo mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Se trata de un diseño de tres factores con medidas repetidas, en el que las unidades de análisis (ojos) que participaron en el estudio pasaron por todas las condiciones definidas por las posibles combinaciones entre los niveles de dichos factores (índice, observador y tiempo). En la comparación de los efectos principales, para controlar la tasa de error o probabilidad de cometer errores de tipo I en comparaciones múltiples, se utilizó la corrección de Bonferroni. Para la comprobación de la validez de la hipótesis de normalidad se empleó el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

Se midió el grado de correlación lineal (mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson) y el grado de acuerdo entre los diferentes índices, observadores y tiempos. El grado de acuerdo se llevó a cabo mediante el análisis de Bland-Altman y se calcularon medidas de consistencia/acuerdo o validez como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes

## EXPERIMENTO 3

El análisis de las mediciones del IAV en las fotografías de fondo de ojo realizadas en un mismo retinógrafo con los diferentes métodos de medición, el cociente de medias, el método de Hubbard-Parr y el método de Hubbard-Parr Revisado e instantes temporales (instante basal y a los 6 meses) se llevó a cabo mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Se trata de un diseño de dos factores, ambos con medidas repetidas, en el que las unidades de análisis (ojos) que participaron en el estudio pasaron por todas las condiciones definidas por las posibles combinaciones entre los niveles de ambos factores (método de medición y tiempo). En la comparación de los efectos

principales, para controlar la tasa de error o probabilidad de cometer errores de tipo I en comparaciones múltiples, se utilizó la corrección de Bonferroni. Para la comprobación de la validez de la hipótesis de normalidad se empleó el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

Se midió el grado de correlación lineal (mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson) y el grado de acuerdo entre los diferentes métodos e instantes de tiempo. El grado de acuerdo se llevó a cabo mediante el análisis de Bland-Altman y se calcularon medidas de consistencia/acuerdo o validez como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

#### EXPERIMENTO 4

La comparación entre ambos métodos de medición, el método automático y el método manual, se llevó a cabo mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de 1 solo factor. Para la comprobación de la validez de la hipótesis de normalidad se empleó el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

Se midió el grado de correlación lineal (mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson) y el grado de acuerdo entre los dos métodos. El grado de acuerdo se llevó a cabo mediante el análisis de Bland-Altman y se calcularon medidas de consistencia/acuerdo o validez como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Considerando el método automático como una prueba diagnóstica para la clasificación de las venas y las arterias del ojo, se calcularon también las medidas de validez de dicha prueba, las probabilidades de clasificar correctamente las venas y/o las arterias.





# Resultados

---



## **EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DE LAS MEDIDAS INTRA E INTEROBSERVADOR Y COMPARACIÓN ENTRE LAS MEDIDAS TOMADAS CON DIFERENTES RETINÓGRAFOS.**

Leyenda:

Retinografía 1 o Topcon color: Fotografía en color tomada con Topcon TRC 50 IX

Retinografía 2 o Topcon bn: Fotografía en blanco y negro tomada con Topcon TRC 50 IX

Retinografía 3 o Zeiss color: Fotografía en color tomada con Zeiss FF450 Plus IR COM Visupac 451

Retinografía 4 o Zeiss bn: Fotografía en blanco y negro tomada con Zeiss FF450 Plus IR COM Visupac 451

Retinografía 5 o Zeiss Visucam: Fotografía en color tomada con Zeiss Visucam

Retinografía 6 o Topconnomd: Fotografía en color tomada con Topcon TRC-NW6S

Obs. 1: Observador 1

Obs. 2: Observador 2

### **1. Estudio de las diferencias en el IAV dependiendo del observador que efectúa las mediciones y de la retinografía empleada:**

	<b>Media</b>	<b>Desviación Típica</b>
<b>Retinografía 1-Obs 1</b>	0,815405	0,0526109
<b>Retinografía 1-Obs 2</b>	0,848672	0,061381
<b>Retinografía 2-Obs 1</b>	0,818970	0,0588674
<b>Retinografía 2-Obs 2</b>	0,847512	0,064987
<b>Retinografía 3-Obs 1</b>	0,818365	0,0587279
<b>Retinografía 3-Obs 2</b>	0,840355	0,061469
<b>Retinografía 4 -Obs 1</b>	0,815765	0,0531193
<b>Retinografía 4-Obs 2</b>	0,84193	0,062366
<b>Retinografía 5 -Obs 1</b>	0,815180	0,0512333
<b>Retinografía 5-Obs 2</b>	0,83949	0,061577
<b>Retinografía 6-Obs 1</b>	0,817435	0,0550607
<b>Retinografía 6-Obs 2</b>	0,847301	0,062693

**Tabla 1:** Datos descriptivos que muestran la media y desviación típica de los valores obtenidos del IAV en las diferentes retinografías realizadas por los dos observadores.

### 1.a. Efecto individual de la retinografía:

No existe efecto significativo de la retinografía, ya que no se puede rechazar la igualdad de medias para las distintas retinografías ( $p=0,479$ ) (Tabla 2).

Posteriormente se realiza la **comparación por pares**:

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre cada par de retinógrafos ( $p=1$ ).

	Media	Error Típico
<b>Retinografía 1</b>	0,832	0,011
<b>Retinografía 2</b>	0,833	0,012
<b>Retinografía 3</b>	0,829	0,012
<b>Retinografía 4</b>	0,829	0,011
<b>Retinografía 5</b>	0,827	0,010
<b>Retinografía 6</b>	0,832	0,011

**Tabla 2:** Media y error típico del IAV para cada fotografía del fondo de ojo

### 1.b. Efecto individual del observador:

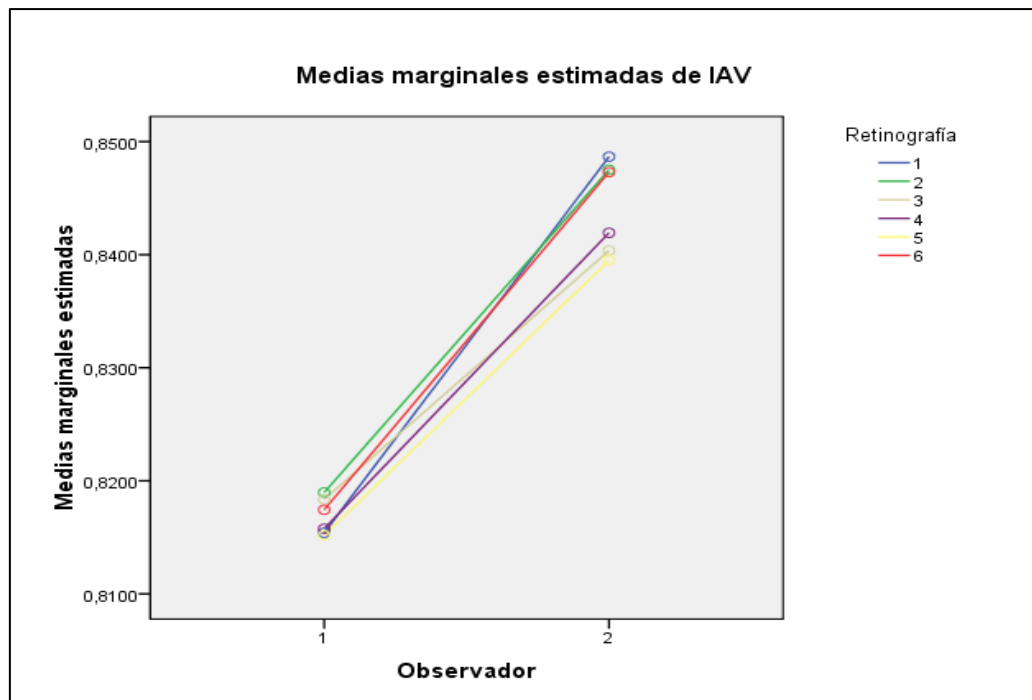
Hay efecto significativo del observador, es decir, las mediciones del IAV no son las mismas para el observador 1 que para el observador 2 ( $p=0,039<0,05$ ). Se observa que el observador 2 proporcionó unas mediciones más elevadas que el observador 1. (Tabla 3).

	Media	Error típico
<b>Observador 1</b>	0,817	0,012
<b>Observador 2</b>	0,844	0,013

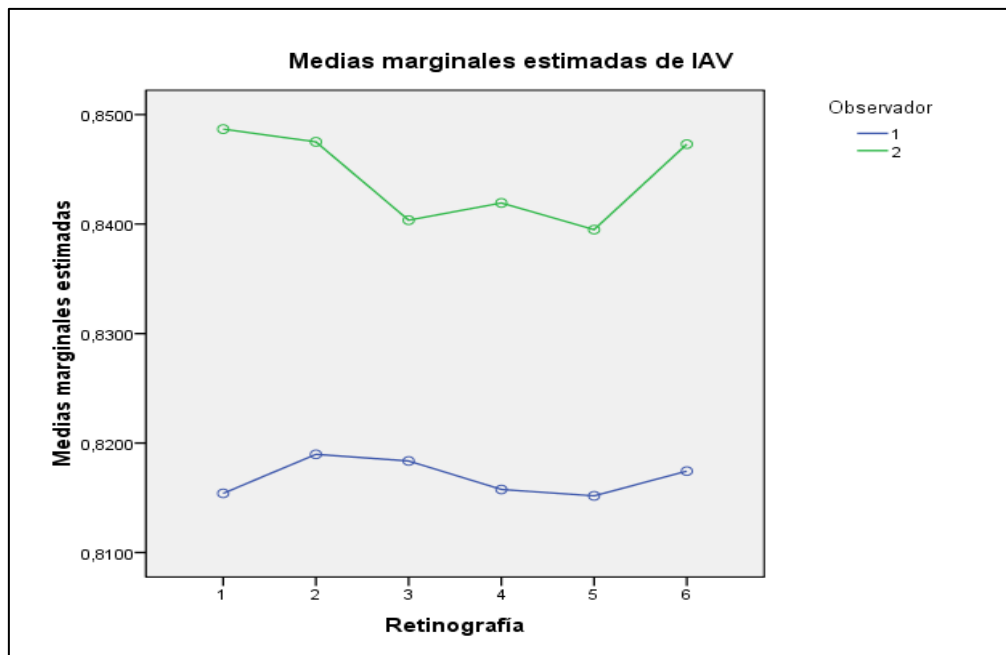
**Tabla 3:** Media de los IAV medidos por los diferentes observadores

### 1.c. Efecto de la interacción retinografía-observador:

No hay efecto significativo de la interacción retinografía-observador ( $p=0,691$ ). El observador 2 siempre anotó unas mediciones más elevadas que el observador 1 en todas las retinografías (Fig. 16 y 17, Tabla 1).



**Figura 16:** Representa las medias de los IAV de ambos observadores para cada retinografía. Las medias del observador 1 son siempre más bajas que las medias del observador 2

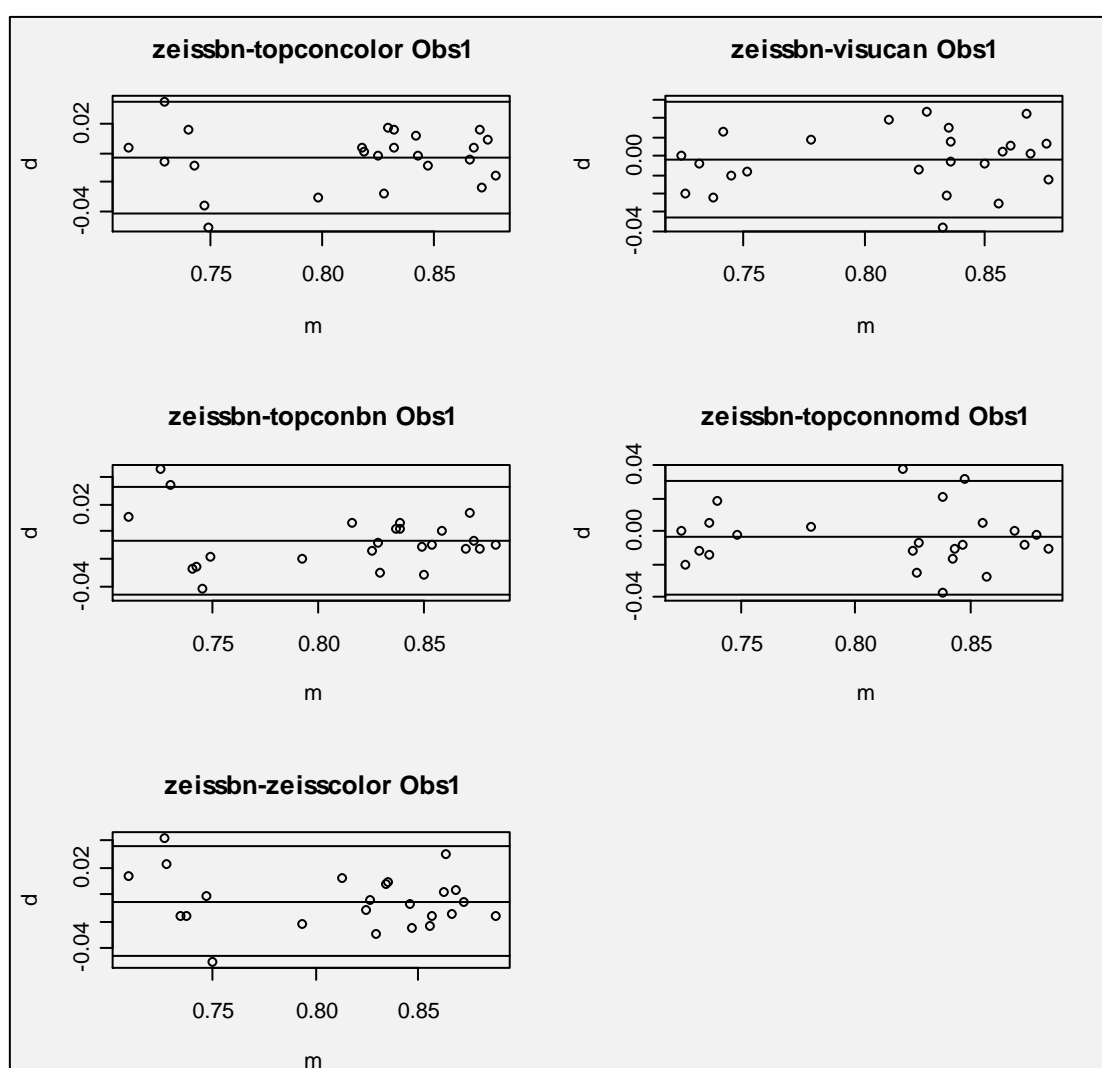


**Figura 17:** Representa las medias de los IAV de ambos observadores para cada retinografía. Las medias del observador 1 son siempre más bajas que las medias del observador 2. Realiza la misma representación que la figura 12 pero cambiando la orientación del gráfico y representando las retinografías en el eje X.

## 2. Grado de acuerdo y correlación entre las diferentes retinografías realizadas por el observador 1:

2.a. Comparación entre la mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro con el retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

### 2.a.1. Representación mediante Gráficos de Bland Altman:



**Figura 18:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Zeiss blanco y negro y las demás retinografías en el observador 1. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 2.a.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro con el retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

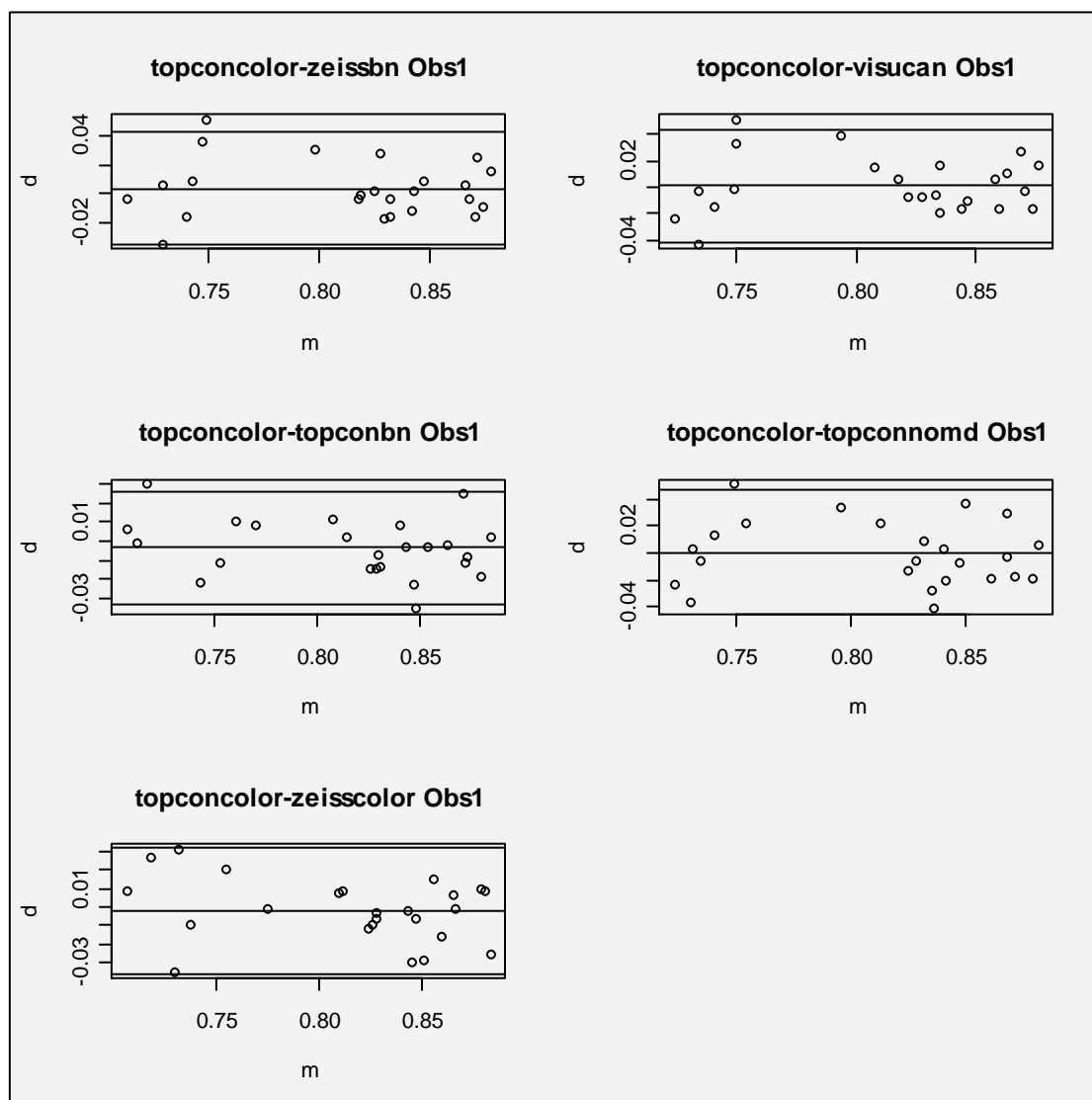
Rango	Topcon Color	Zeiss Visucam	Topcon BN	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Zeiss BN	0,0418-0,0354	0,033-0,0288	0,0466-0,0332	0,0387-0,0309	0,0458-0,0359
	0,94	0,96	0,93	0,95	0,93

**Tabla 4:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 1 entre la retinografía Zeiss Blanco y negro y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.



**2.b.Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía en color hecha con el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:**

**2.b.1. Representación mediante Gráficos de Bland Altman:**



**Figura 19:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Zeiss color y las demás retinografías en el observador 1. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 2.b.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

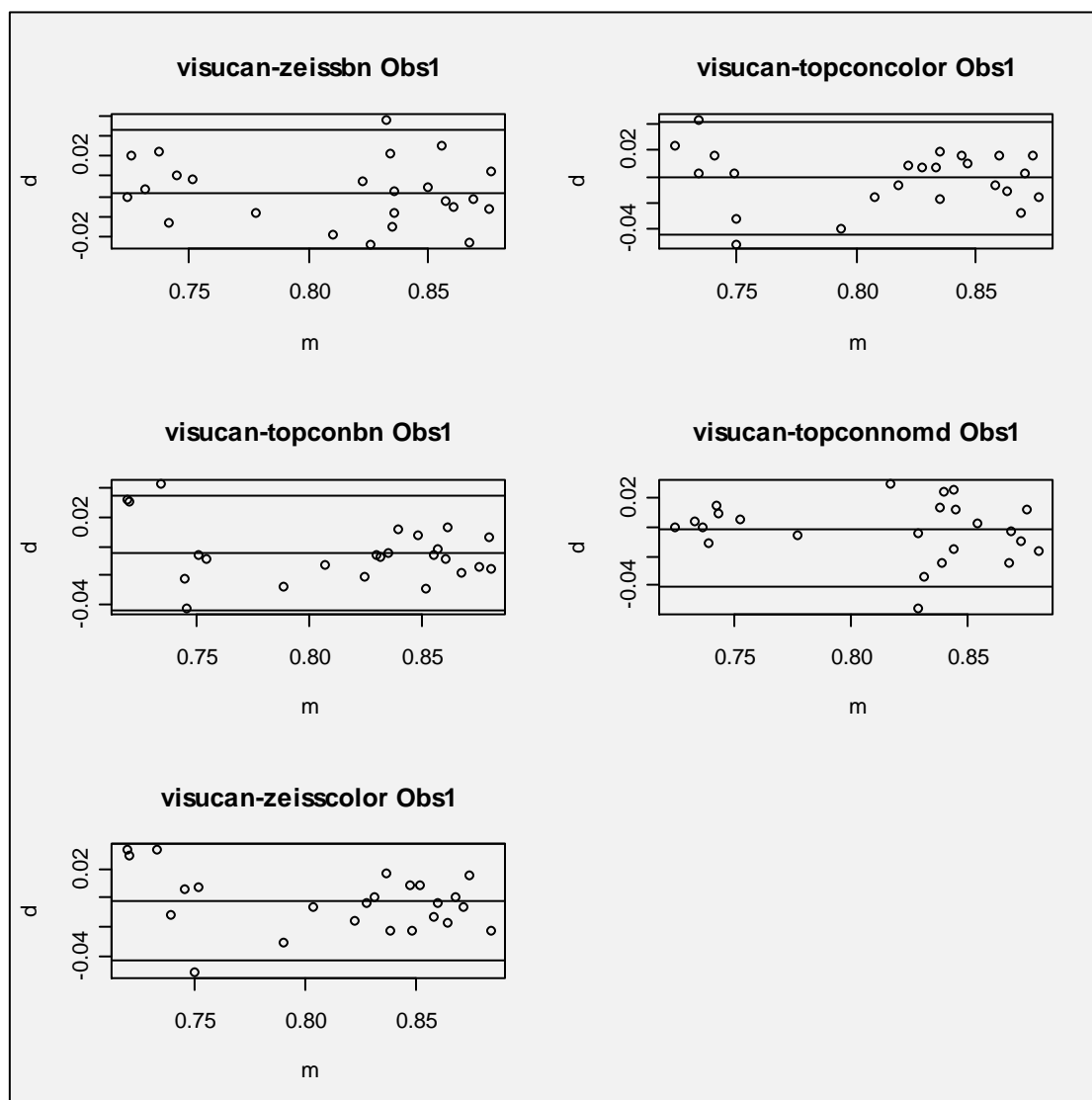
En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Zeiss Visucam	Topcon BN	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Topcon Color	0,0354-0.0418	0,0417-0,0439	0,0328-0,0258	0,0481-0,0469	0,0358-0,0324
	0,94	0.92	0,96	0,91	0,95

**Tabla 5:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 1 entre la retinografía Topcon color y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

## 2.c. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía hecha en el retinógrafo Zeiss Visucam y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

### 2.c.1. Representación mediante Gráficos de Bland Altman:



**Figura 20:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Zeiss Visucam y las demás retinografías en el observador 1. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

## 2.c.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Zeiss Visucam y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

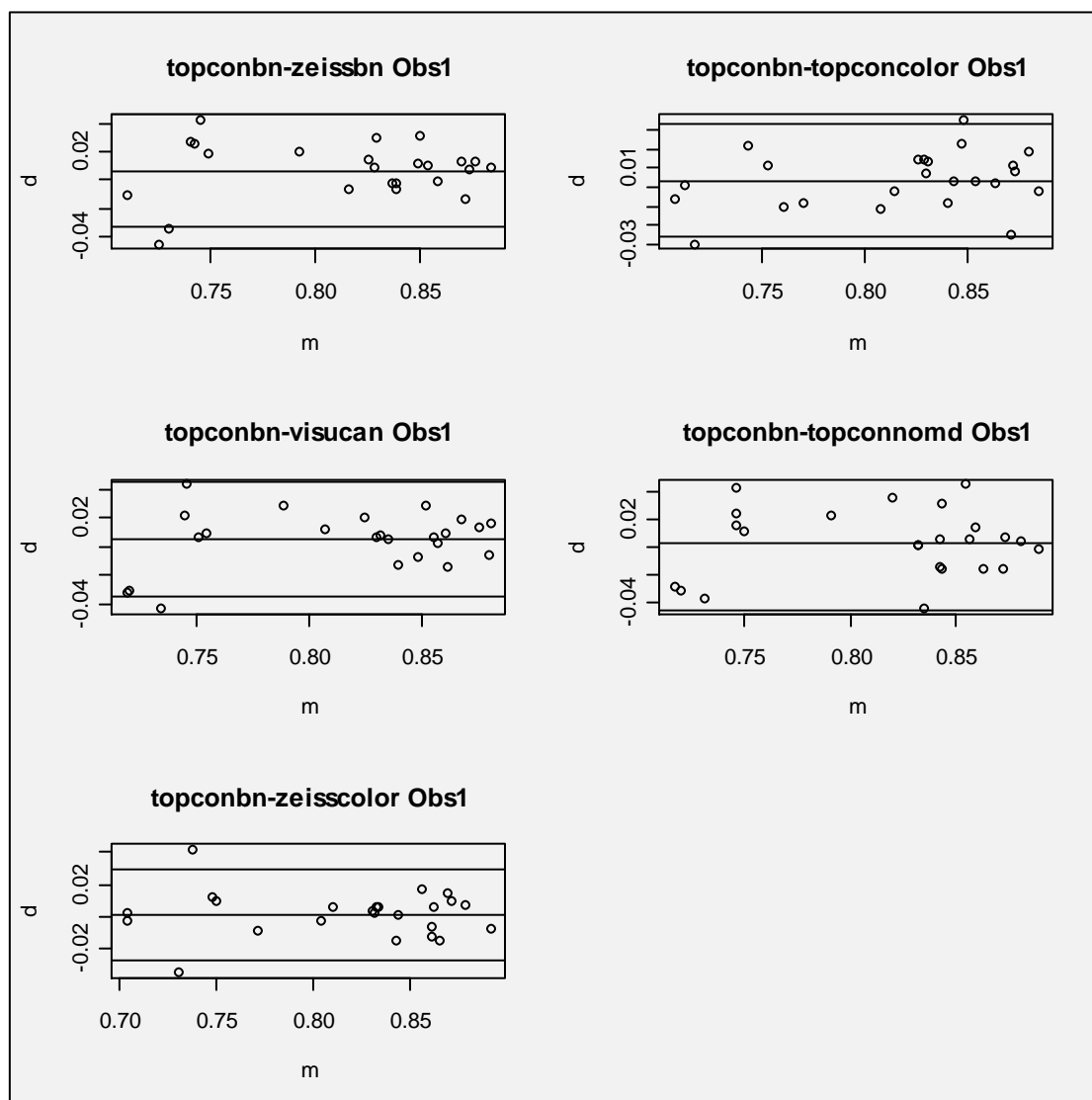
En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Topcon Color	Topcon BN	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Zeiss	0,0288-0,033	0,0439-0,0417	0,0443-0,0351	0,0412-0,0377	0,0433-0,0376
Visucam	0,96	0,92	0,93	0,93	0,93

**Tabla 6:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 1 entre la retinografía Zeiss Visucam y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

**2.d. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro entre el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:**

**2.d.1. Representación mediante Gráficos de Bland- Altman:**



**Figura 21:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Topcon blanco y negro y las demás retinografías en el observador 1. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 2.d.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro con el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

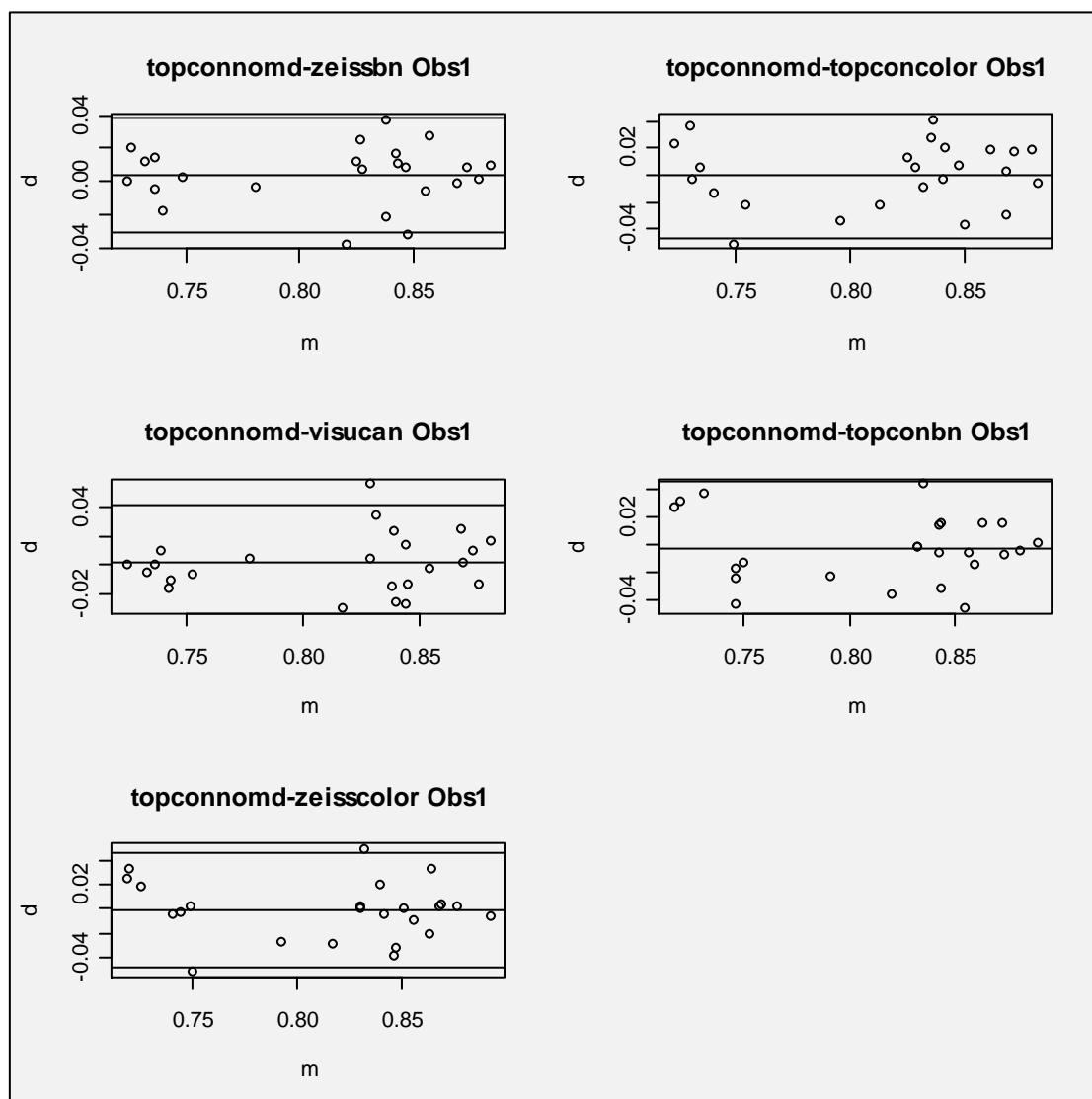
En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Topcon Color	Zeiss Visucam	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Topcon BN	0,0332-0,466	0,0258-0,328	0,0351-0,443	0,0449-0,0506	0,0265-0,03
	0,93	0,96	0,93	0,91	0,97

**Tabla 7:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 1 entre la retinografía Topcon Blanco y Negro y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

## 2.e. Comparación entre las mediciones realizadas en la retonografía hecha con el retinógrafo Topcon no midriático y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

### 2.e.1. Representación mediante Gráficos de Bland- Altman:



**Figura 22:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Topcon no midriático y las demás retinografías en el observador 1. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

## 2.e.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía con el retinógrafo Topcon no midriático y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

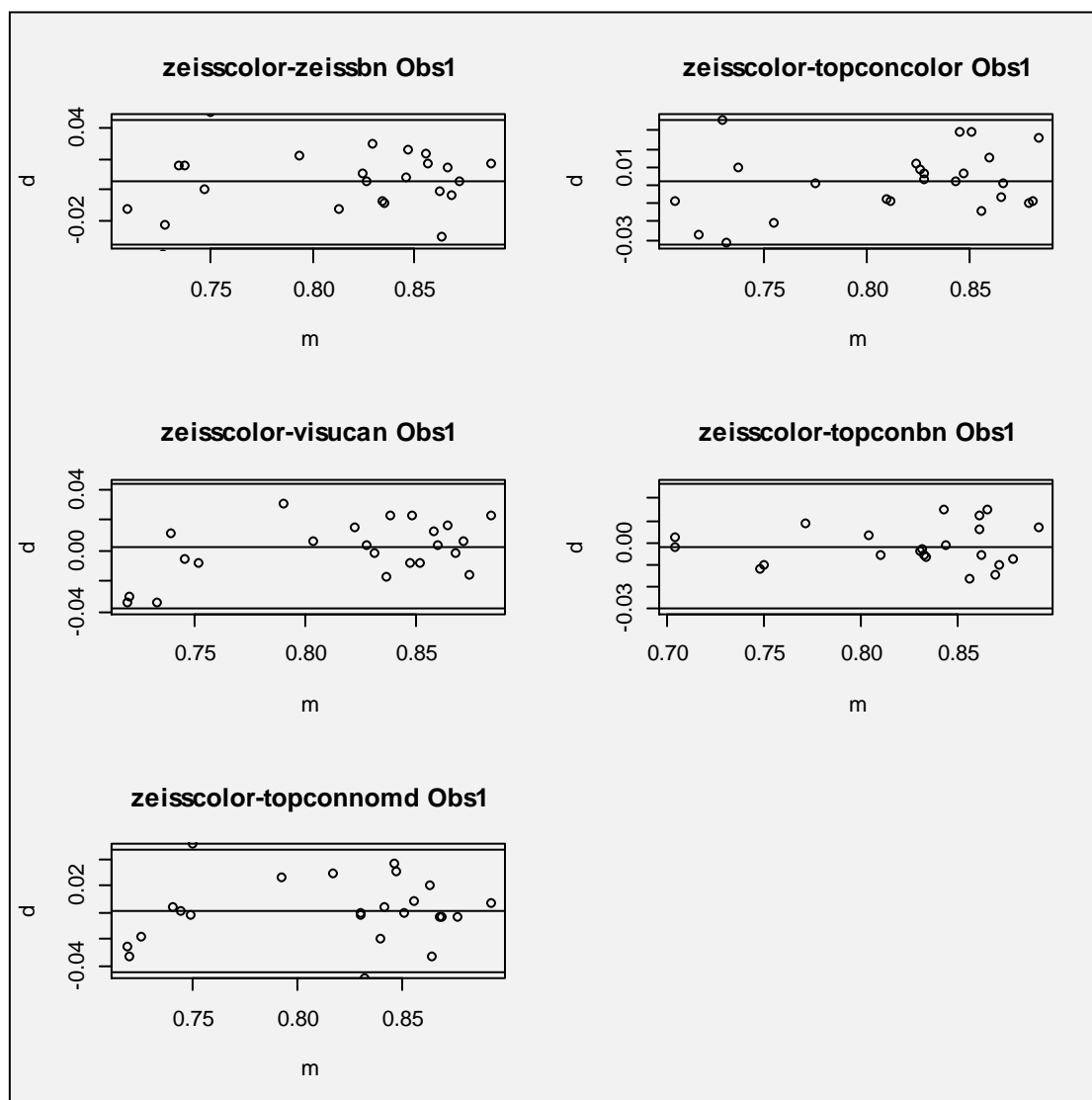
Rango	Zeiss BN	Topcon color	Zeiss Visucam	Topcon BN	Zeiss Color
Consistencia					
Topcon NM	0,0309-0,0387	0,0469-0,0481	0,0377-0,0412	0,0506-0,0449	0,0476-0,0454
	0,95	0.91	0,93	0,91	0,92

**Tabla 8:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 1 entre la retinografía Topcon NM y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.



**2.f. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía en color hecha con el retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:**

**2.f.1. Representación mediante Gráficos de Bland- Altman:**



**Figura 23:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Zeiss color y las demás retinografías en el observador 1. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

## 2.f.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 1:

En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Topcon Color	Zeiss Visucam	Topcon BN	Topcon NM
Consistencia					
Zeiss Color	0,0359-0.0458	0,0324-0,0358	0,0376-0,433	0,03-0,0265	0,0454-0,0476
	0,93	0.95	0,93	0,97	0,92

**Tabla 9:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 1 entre la retinografía Zeiss color y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

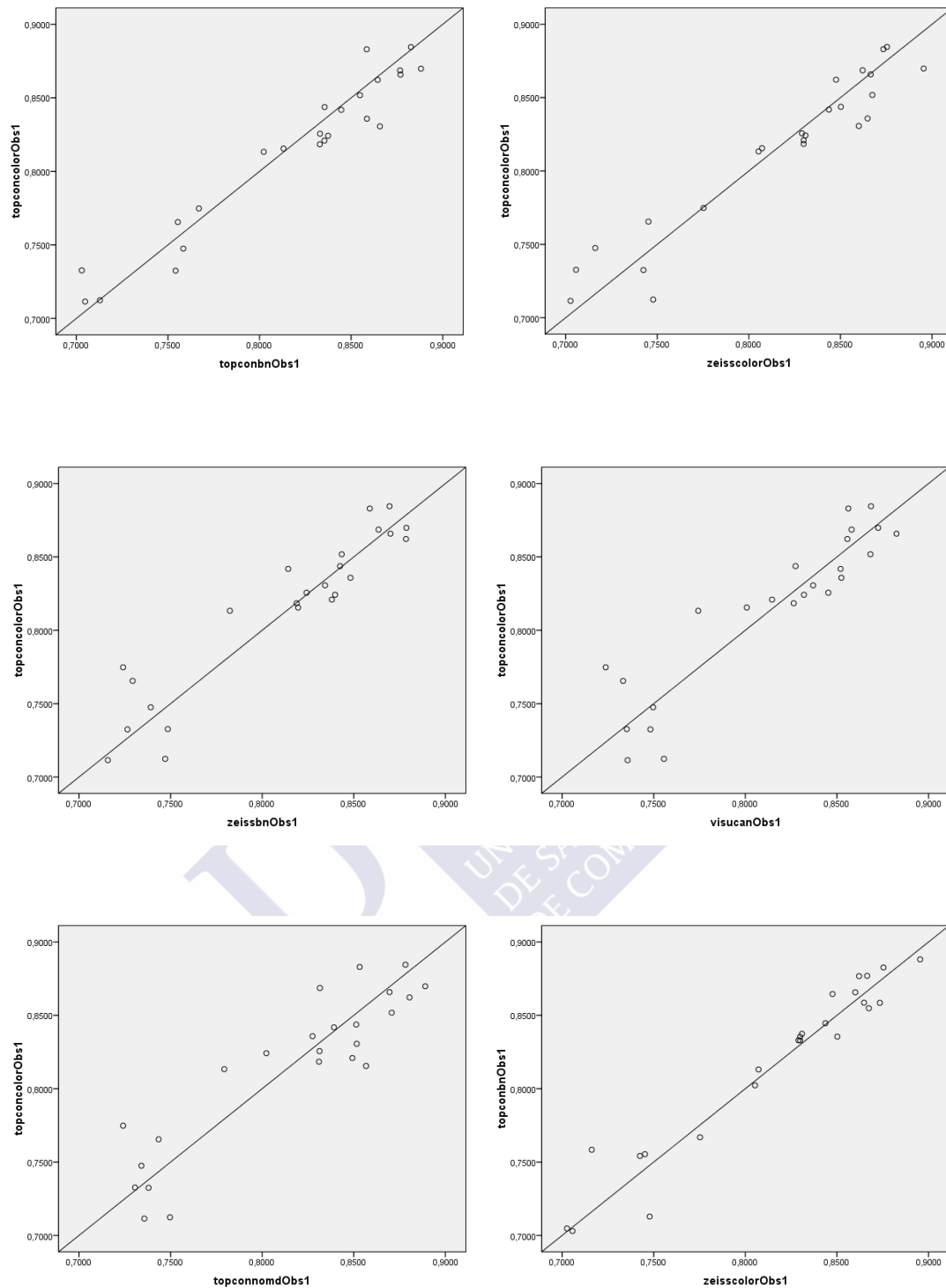
## 2.g. Correlación lineal entre diferentes retinografías con el observador 1:

Se obtuvo una buena relación lineal entre los diferentes retinógrafos, en todos los casos se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de Pearson superior a 0,9 y la mayor correlación se registró entre los retinógrafos Topcon blanco y negro y Zeiss color ( $r=0,97$ ) y Topcon blanco y negro y Topcon color ( $r=0,968$ ). La menor correlación se observó entre los retinógrafos Topcon no midriático y Topcon color ( $r=0,905$ ). (Tabla 10, Fig. 24).

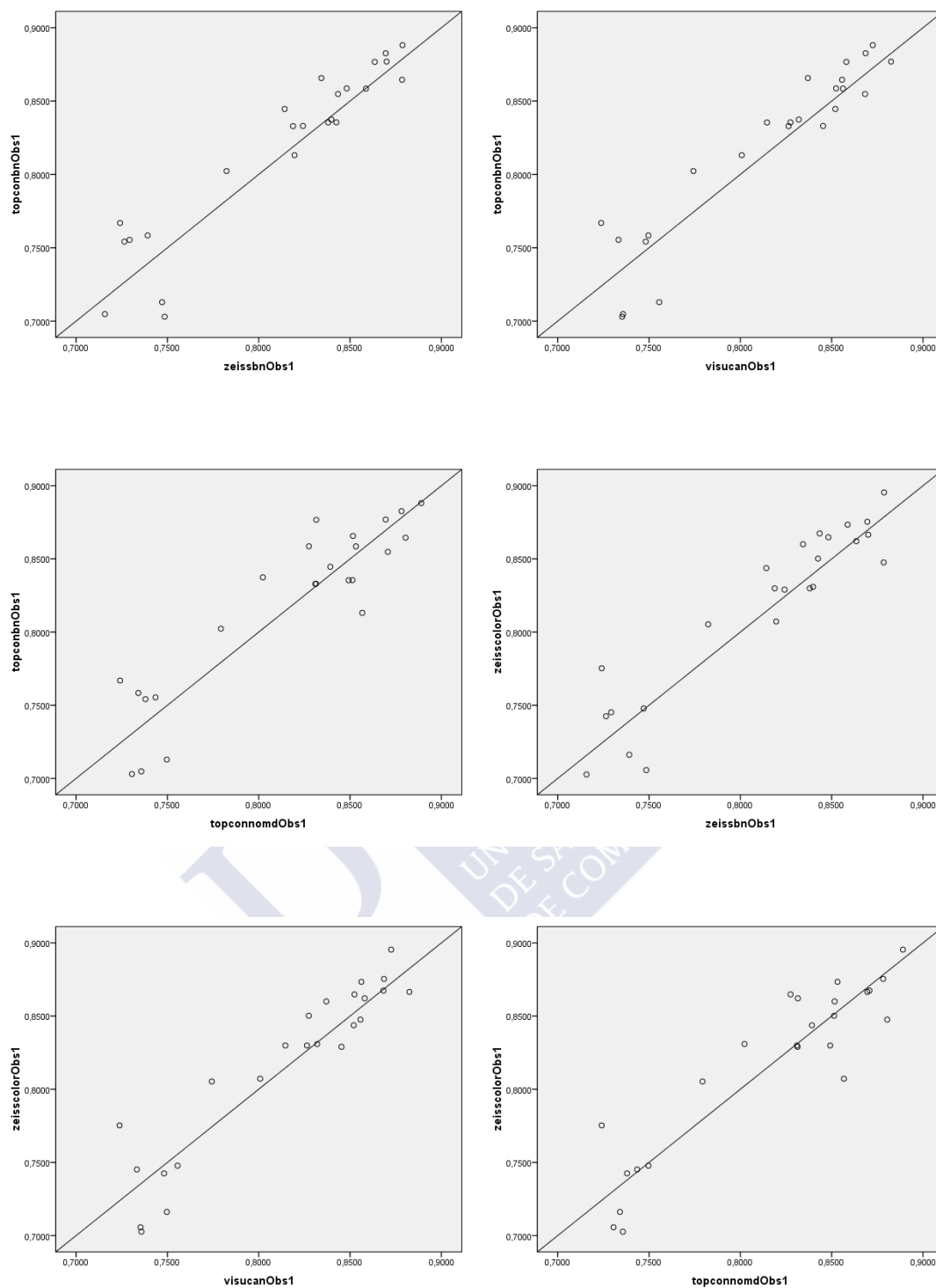
Correlación lineal de Pearson	Topconcolor Obs1	Topconbn Obs 1	Zeisscolor Obs 1	Zeissbn Obs 1	Zeiss Visucam Obs 1	Topconnomd Obs 1
Topconcolor Obs1	1	0,968	0,957	0,936	0,917	0,905
Topconbn Obs 1	0,968	1	0,970	0,938	0,939	0,911
Zeisscolor Obs 1	0,957	0,970	1	0,936	0,938	0,917
Zeissbn Obs 1	0,936	0,938	0,936	1	0,959	0,950
Zeiss Visucam Obs 1	0,917	0,939	0,938	0,959	1	0,934
Topconnomd Obs 1	0,905	0,911	0,917	0,950	0,934	1

La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

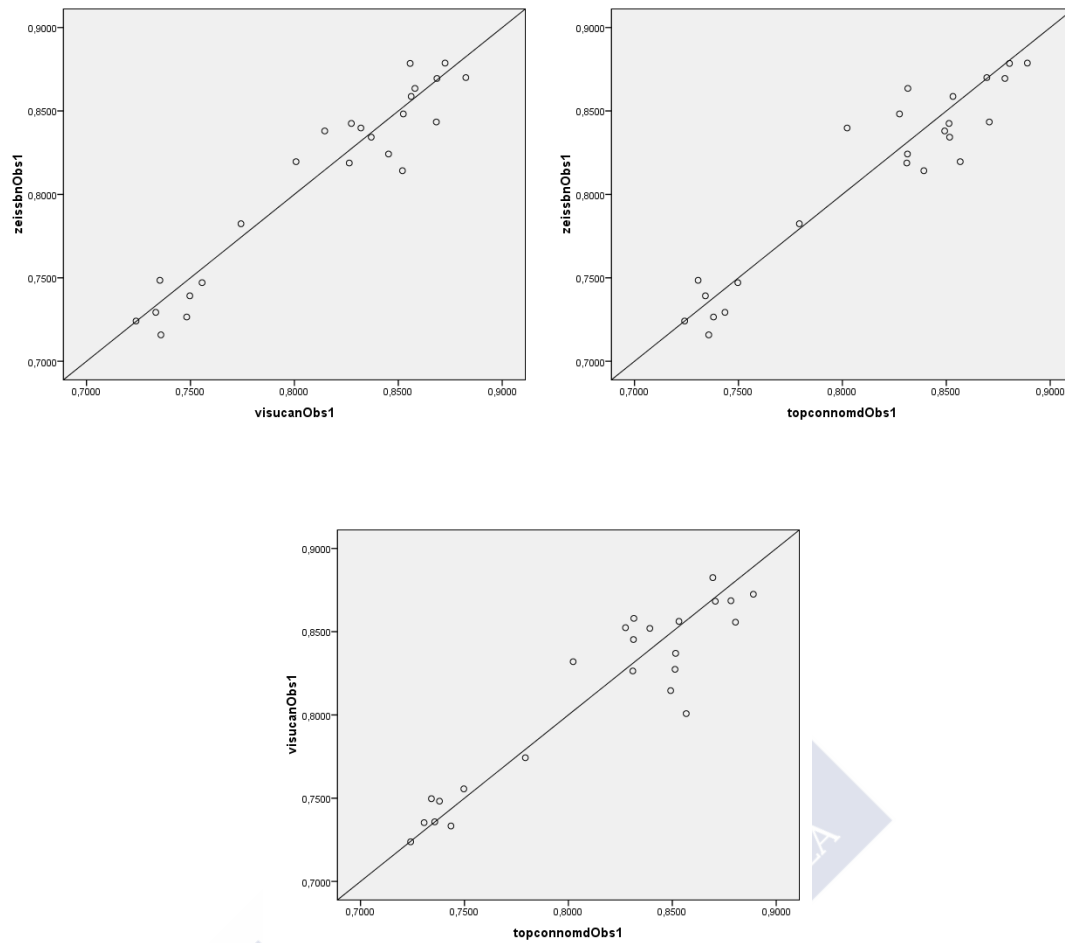
**Tabla 10:** Correlación entre las diferentes retinografías con el observador 1.



**Figura 24 (1):** Recta de regresión que muestra la buena correlación lineal entre los IAV medidos por el observador 1 en las distintas retinografías.



**Figura 24 (2):** Recta de regresión que muestra la buena correlación lineal entre los IAV medidos por el observador 1 en las distintas retinografías.

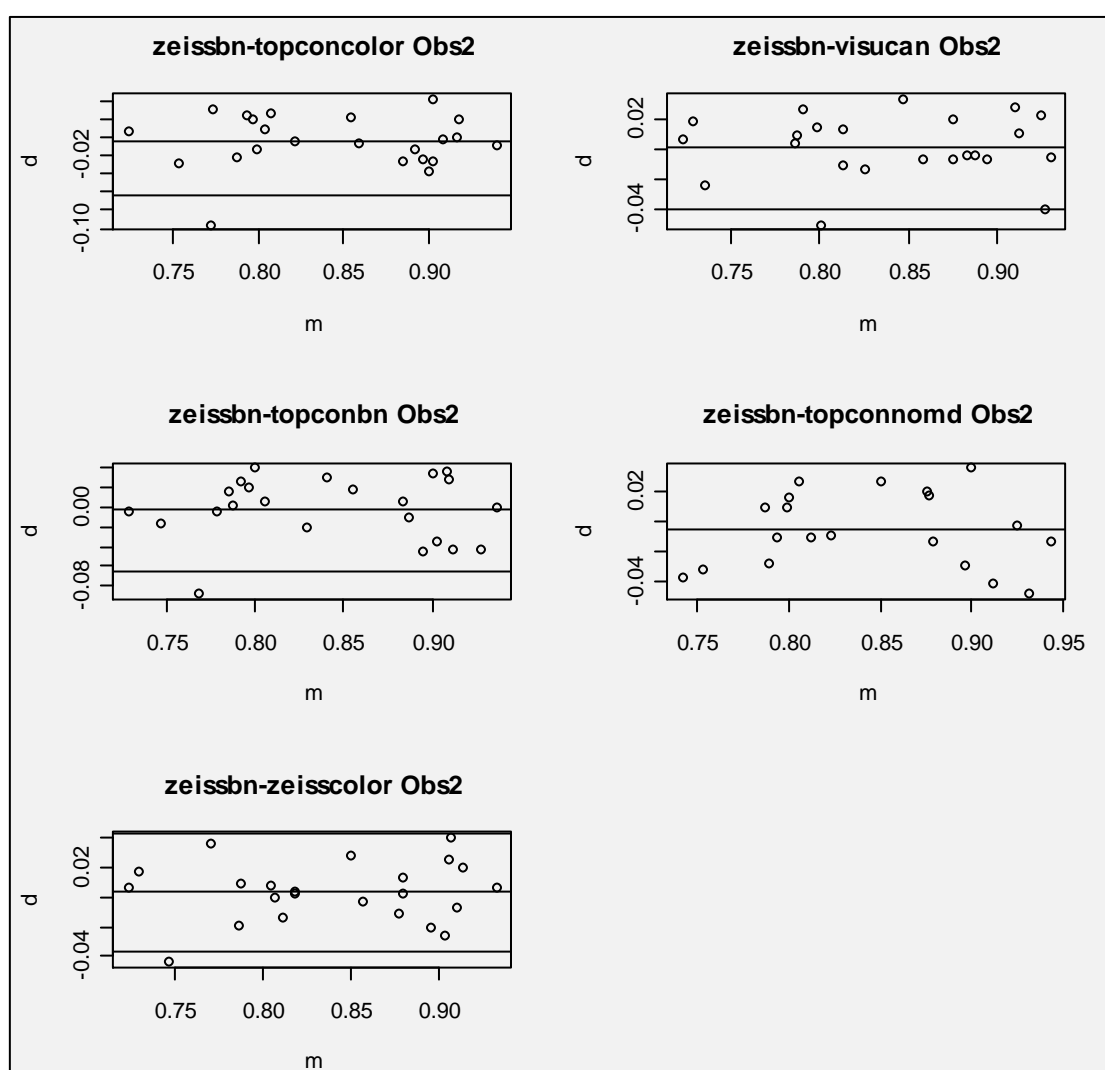


**Figura 24 (3):** Recta de regresión que muestra la buena correlación lineal entre los IAV medidos por el observador 1 en las distintas retinografías.

### 3. Grado de acuerdo y correlación entre las diferentes retinografías realizadas por el observador 2:

3.a. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro con la retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

#### 3.a.1. Representación mediante Gráficos de Bland- Altman:



**Figura 25:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Zeiss blanco y negro y las demás retinografías en el observador 2. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 3.a.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro con el retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

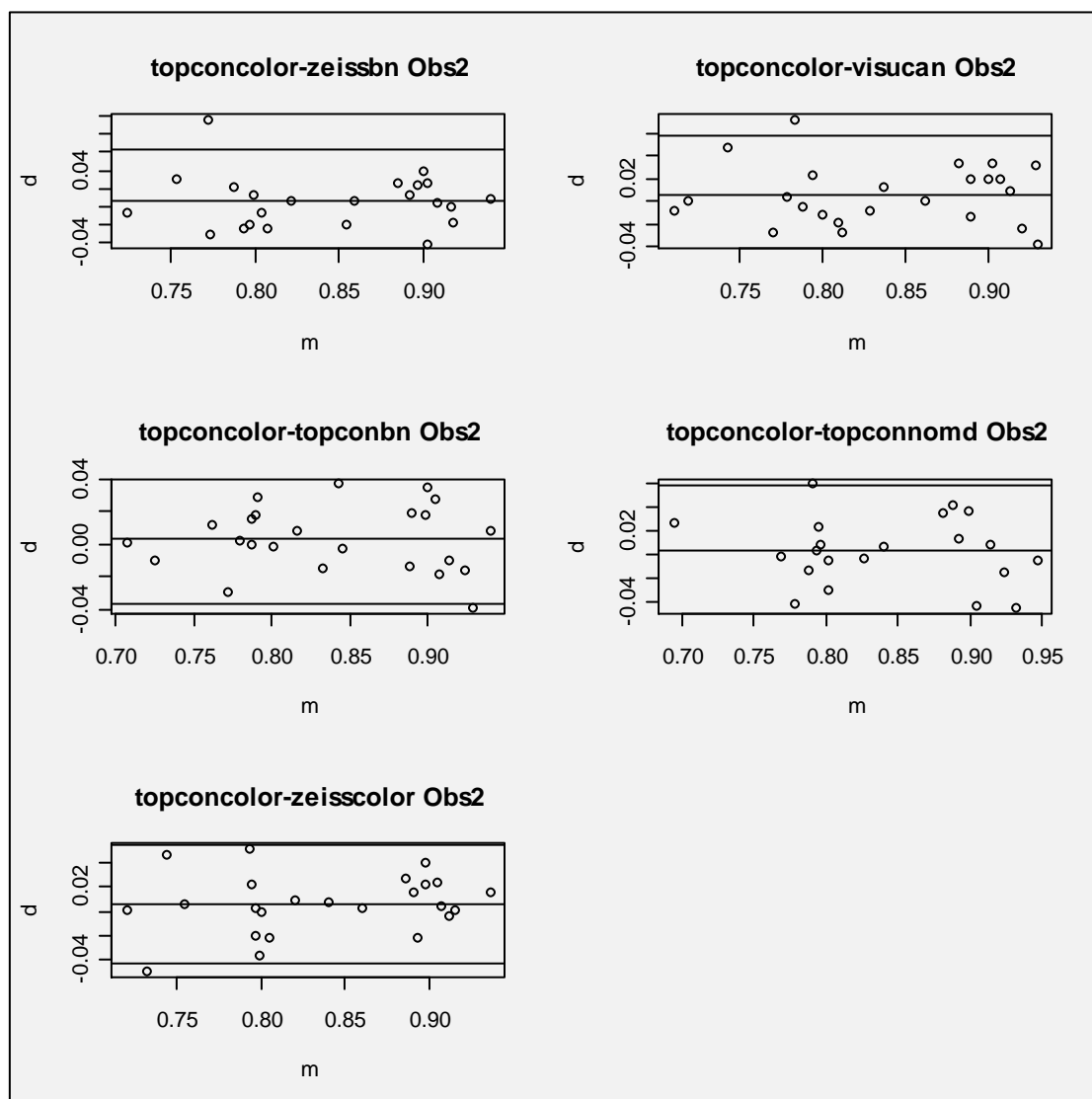
Rango	Topcon Color	Zeiss Visucam	Topcon BN	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Zeiss BN	0,0627-0,0526	0,0396-0,0435	0,0656-0,0615	0,055-0,0442	0,0363-0,0429
	0,90	0,95	0,88	0,92	0,95

**Tabla 11:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 2 entre la retinografía Zeiss BN y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.



### 3.b. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

#### 3.b.1. Representación mediante Gráficos de Bland- Altman:



**Figura 26:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Topcon color y las demás retinografías en el observador 2. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 3.b.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

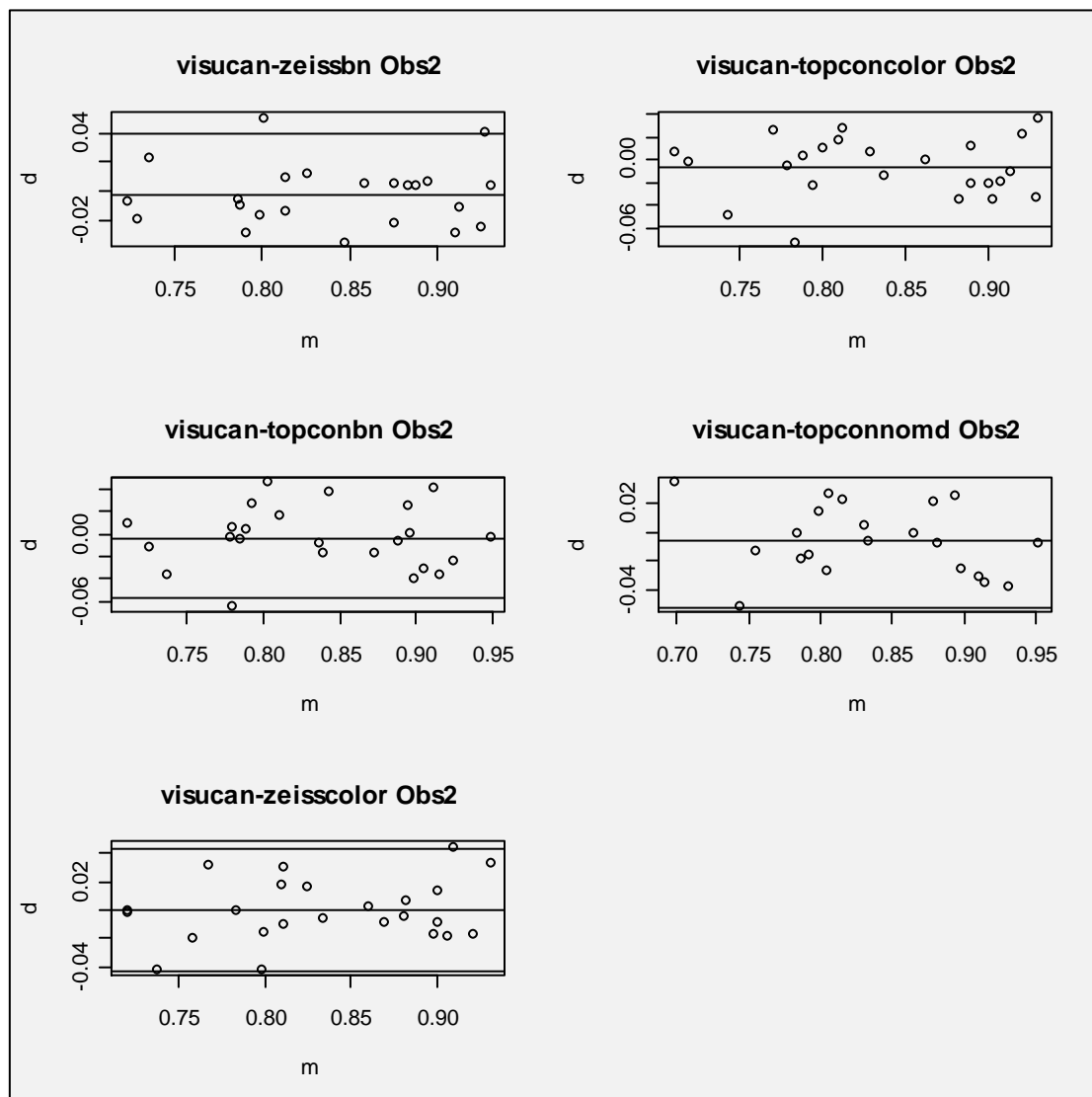
En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclass (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Zeiss Visucam	Topcon BN	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Topcon	0,0526-0,0627	0,0454-0,5081	0,0363-0,0422	0,0532-0,0584	0,0424-0,0541
Color	0,90	0,93	0,96	0,92	0,93

**Tabla 12:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 2 entre la retinografía Topcon color y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

**3.c. Comparación entre las mediciones de la retinografía realizada con el retinógrafo Zeiss Visucam y los demás retinógrafos realizando las mediciones el observador 2:**

**3.c.1. Representación mediante Gráficos de Bland-Altman:**



**Figura 27:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Zeiss Visucam y las demás retinografías en el observador 2. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 3.c.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Zeiss Visucam y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

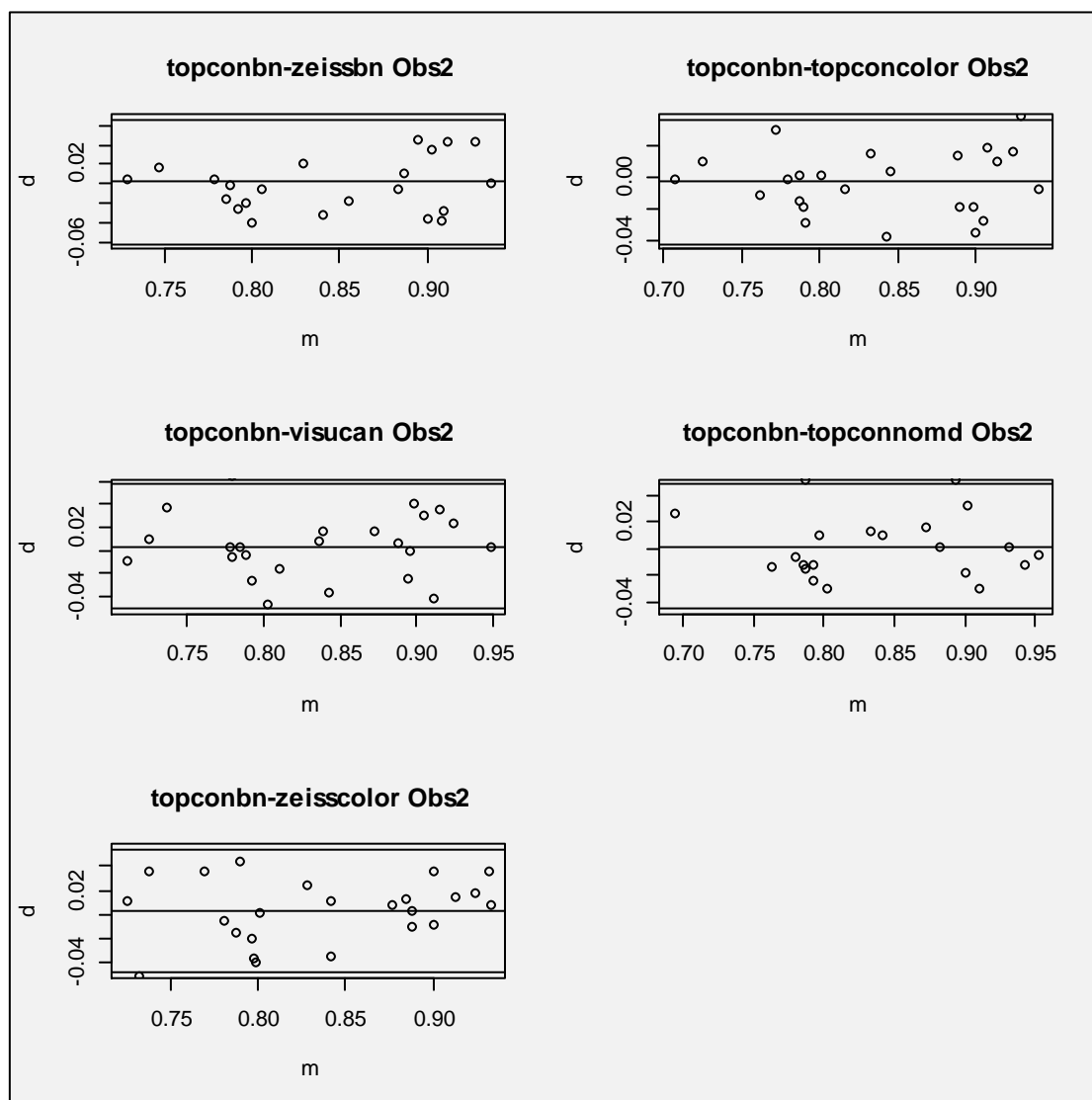
En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclass (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Topcon Color	Topcon BN	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Zeiss Visucam	0,0435-0,0396	0,0581-0,0454	0,0571-0,0502	0,0522-0,0406	0,0438-0,0428
	0,95	0,93	0,92	0,94	0,95

**Tabla 13:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 2 entre la retinografía Zeiss Visucam y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

**3.d. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro con el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:**

**3.d.1. Representación mediante Gráficos de Bland- Altman:**



**Figura 28:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Topcon blanco y negro y las demás retinografías en el observador 2. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 3.d.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en blanco y negro con el retinógrafo Topcon y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

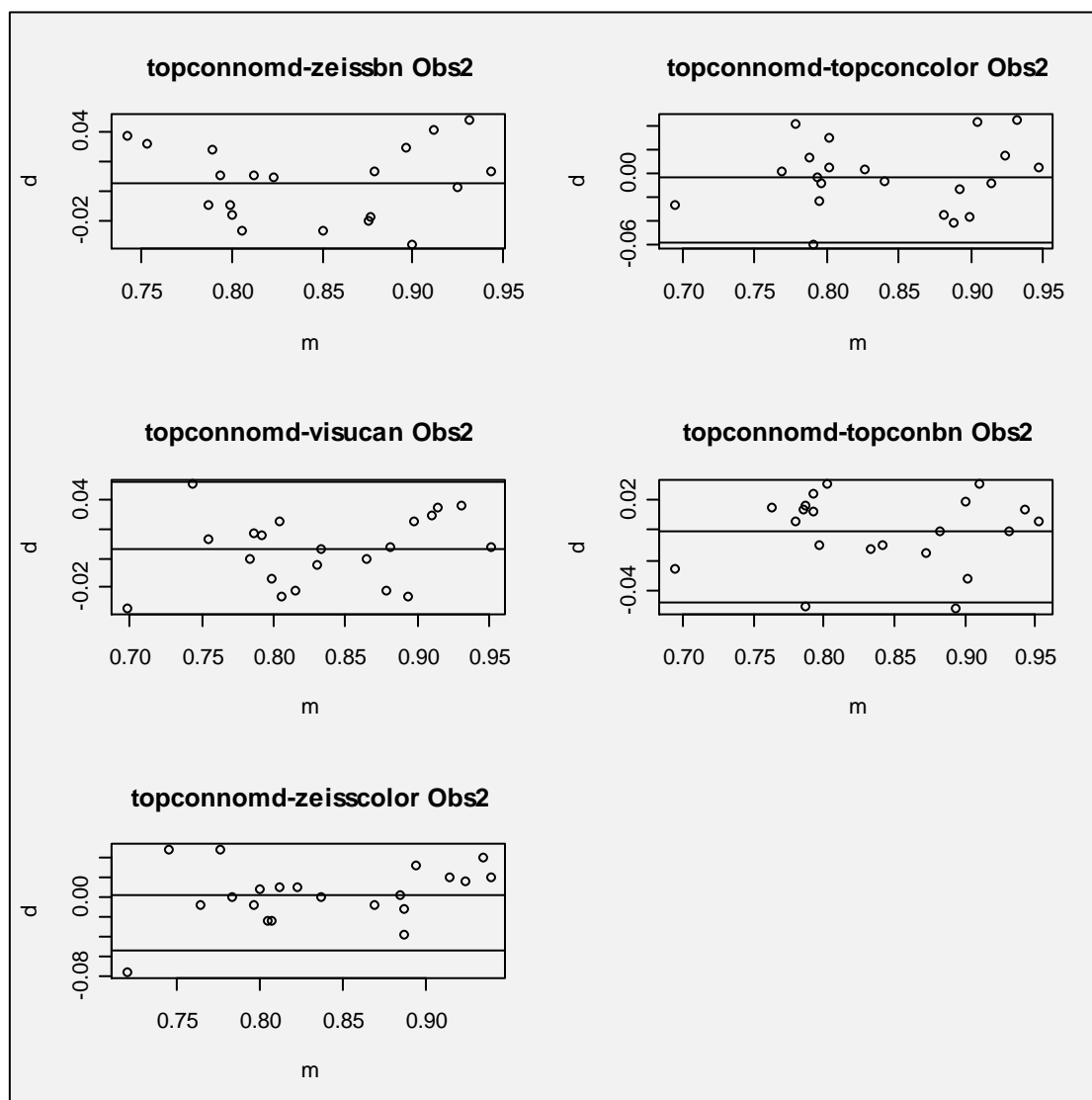
En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclass (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Topcon Color	Zeiss Visucam	Topcon NM	Zeiss Color
Consistencia					
Topcon BN	0,0615-0,656	0,0422-0,0363	0,0502-0,0571	0,045-0,0479	0,0484-0,0543
	0,88	0,96	0,92	0,95	0,93

**Tabla 14:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 2 entre la retinografía Topcon BN y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

### 3.e. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía con el retinógrafo Topcon no midriático y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

#### 3.e.1. Representación mediante Gráficos de Bland-Altman:



**Figura 29:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Topcon no midriático y las demás retinografías en el observador 2. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 3.e.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía con el retinógrafo Topcon NM y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclass (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

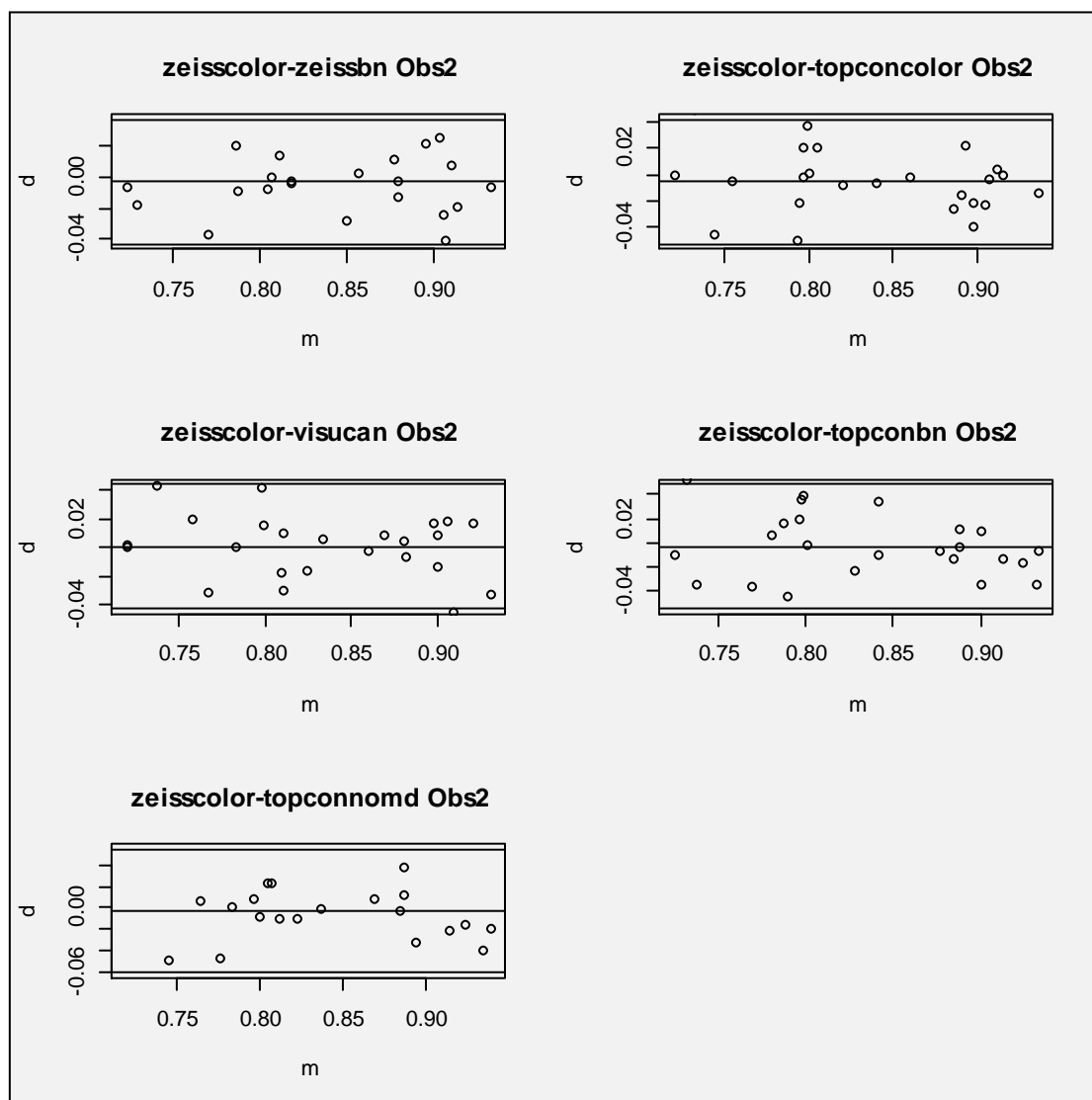
Rango	Zeiss BN	Topcon Color	Zeiss Visucam	Topcon BN	Zeiss Color
Consistencia					
Topcon NM	0,0442-0,055	0,0584-0,0532	0,0406-0,0522	0,0479-0,045	0,0549-0,0608
	0,92	0,92	0,94	0,95	0,90

**Tabla 15:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 1 entre la retinografía Topcon NM y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.



### 3.f. Comparación entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

#### 3.f.1. Representación mediante Gráficos de Bland- Altman:



**Figura 30:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con Zeiss color y las demás retinografías en el observador 2. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

### 3.f.2. Límites de acuerdo entre las mediciones realizadas en la retinografía en color con el retinógrafo Zeiss y las demás retinografías realizando las mediciones el observador 2:

En todos los casos se observó una elevada consistencia/fiabilidad/grado de acuerdo entre los métodos, medido a través del coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes.

Rango	Zeiss BN	Topcon Color	Zeiss Visucam	Topcon BN	Topcon NM
Consistencia					
Zeiss Color	0,0429-0,0363	0,0541-0,0424	0,0428-0,0438	0,0543-0,484	0,0608-0,0549
	0,95	0,93	0,95	0,93	0,90

**Tabla 16:** Se muestra el grado de acuerdo entre los valores obtenidos por el observador 2 entre la retinografía Zeiss color y las demás retinografías. También se muestra el rango dentro del cual se espera que estén el 95% de las diferencias entre los métodos.

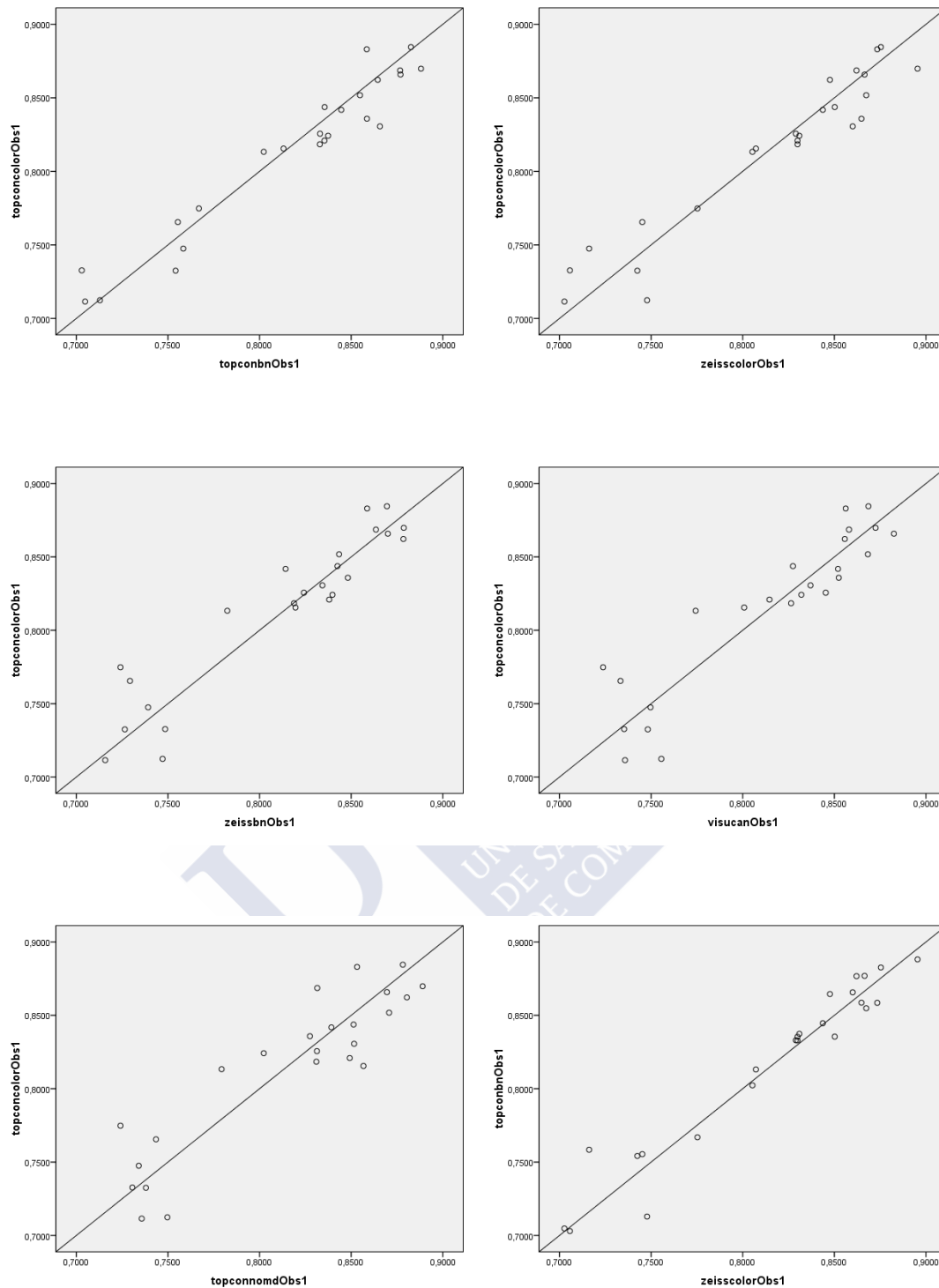
### 3.g. Correlación lineal entre las mediciones realizadas en las diferentes retinografías por el observador 2:

Se obtuvo una buena relación lineal entre las diferentes retinografías al realizar las mediciones el observador 2. En todos los casos se observó un coeficiente de correlación lineal de Pearson próximo a 0,9 y la mayor correlación se registró entre los retinógrafos Topcon blanco y negro y Topcon color ( $r=0,959$ ) y Zeiss blanco y negro y Zeiss color ( $r=0,952$ ). La menor correlación se observó entre los retinógrafos Topcon blanco y negro y Zeiss blanco y negro ( $r=0,879$ ). (Tabla 17, Fig. 31).

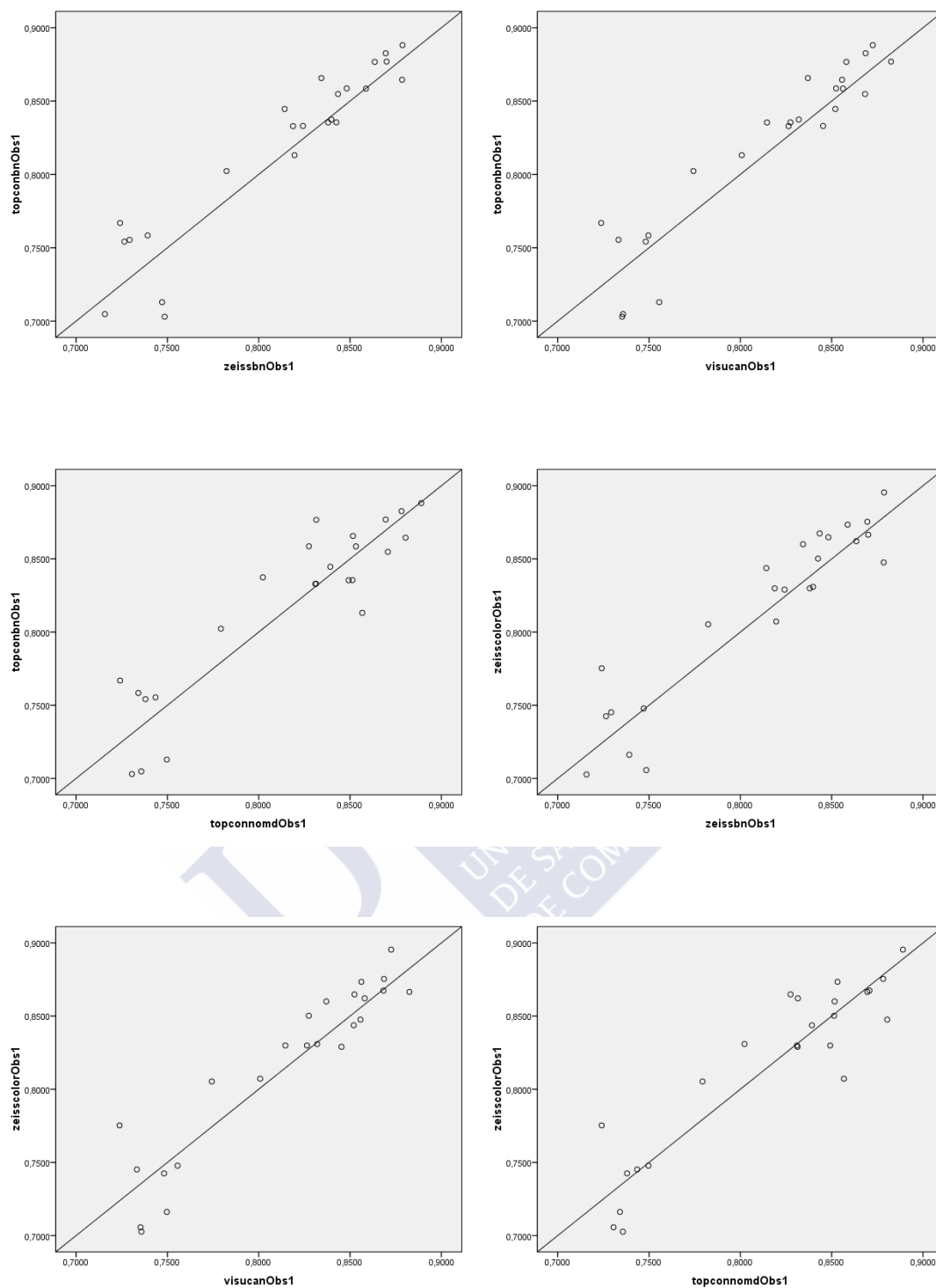
Correlación lineal de Pearson	Topconcolor Obs 2	Topconbn Obs 2	Zeisscolor Obs 2	Zeissbn Obs 2	Zeiss Visucam Obs 2	Topconnomd Obs 2
Topconcolor Obs 2	1	0,959	0,935	0,898	0,927	0,917
Topconbn Obs 2	0,959	1	0,928	0,879	0,923	0,944
Zeisscolor Obs 2	0,935	0,928	1	0,952	0,948	0,910
Zeissbn Obs 2	0,898	0,879	0,952	1	0,948	0,918
Zeiss Visucam Obs 2	0,927	0,923	0,948	0,948	1	0,943
Topconnomd Obs 2	0,917	0,944	0,910	0,918	0,918	1

La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

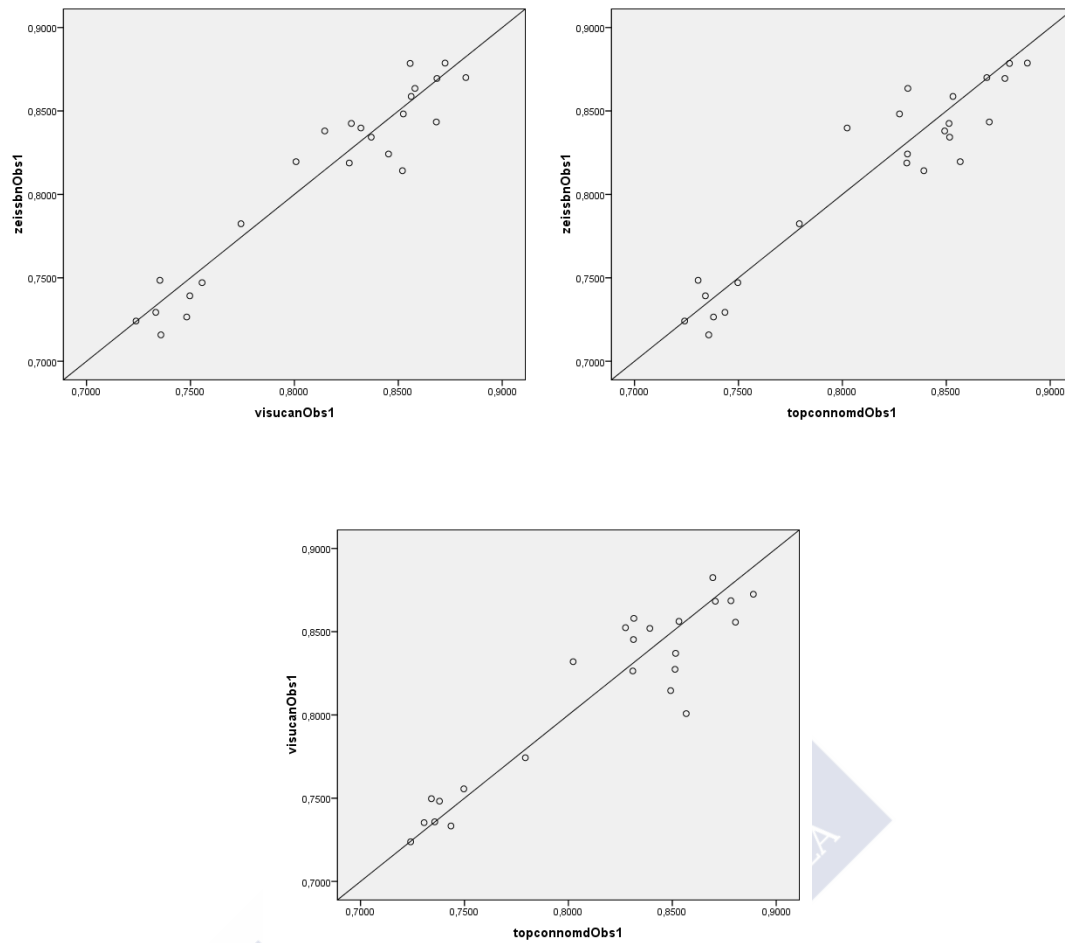
**Tabla 17:** Se muestra la correlación entre las mediciones realizadas en las diferentes retinografías por el observador 2.



**Figura 31 (1):** Recta de regresión que muestra la buena correlación lineal entre los IAV medidos por el observador 2 en las distintas retinografías.



**Figura 31 (2):** Recta de regresión que muestra la buena correlación lineal entre los IAV medidos por el observador 2 en las distintas retinografías.



**Figura 31 (3):** Recta de regresión que muestra la buena correlación lineal entre los IAV medidos por el observador 2 en las distintas retinografías.

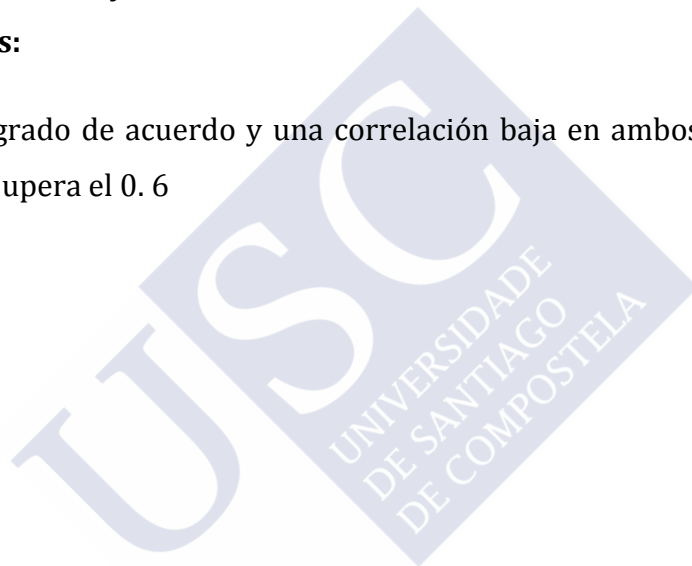
#### **4. Grado de acuerdo y Correlación lineal entre los dos observadores:**

##### **4.a. Grado de acuerdo y Correlación lineal entre los dos observadores independientemente de la retinografía empleada:**

Existe un grado de acuerdo y una correlación baja en ambos supuestos que en ningún caso supera el 0.6

##### **4.b. Grado de acuerdo y Correlación lineal entre observadores para cada par de retinografías:**

Existe un grado de acuerdo y una correlación baja en ambos supuestos que en ningún caso supera el 0.6



## **EXPERIMENTO 2: VALIDACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE MEDICIÓN BASADO EN SNAKES.**

Leyenda:

Obs 1S basal: Medida de las mediciones realizadas por el observador 1 en el instante basal, con el método de medición *Snake*.

Obs 2S basal: Medida de las mediciones realizadas por el observador 2 en el instante basal, con el método de medición *Snake*.

Obs 1L final: Medida de las mediciones realizadas por el observador 1 en el instante final, con el método de medición lineal.

Obs 2L final: Medida de las mediciones realizadas por el observador 2 en el instante final, con el método de medición lineal.

	Media	Desviación Típica
<b>Observ 1S basal</b>	0,797308	0,0634830
<b>Observ 1S final</b>	0,818174	0,0590225
<b>Observ 2S basal</b>	0,757443	0,0561080
<b>Observ 2S final</b>	0,812837	0,0508872
<b>Observ 1L basal</b>	0,790473	0,0657234
<b>Observ 1L final</b>	0,812657	0,0638463
<b>Observ 2L basal</b>	0,753263	0,0573756
<b>Observ 2L final</b>	0,810360	0,0516043

**Tabla 18:** Análisis descriptivo donde se muestran la media y desviaciones típicas de las mediciones de ambos observadores con ambos métodos de medición en los diferentes instantes.



## **1. Índice *Snake*:**

Hay un efecto significativo del observador, del tiempo y de la interacción observador-tiempo ( $p=0$ ).

### **1.a. Estudio comparativo entre ambos observadores:**

El observador 1 proporcionó mediciones significativamente más elevadas que el observador 2.

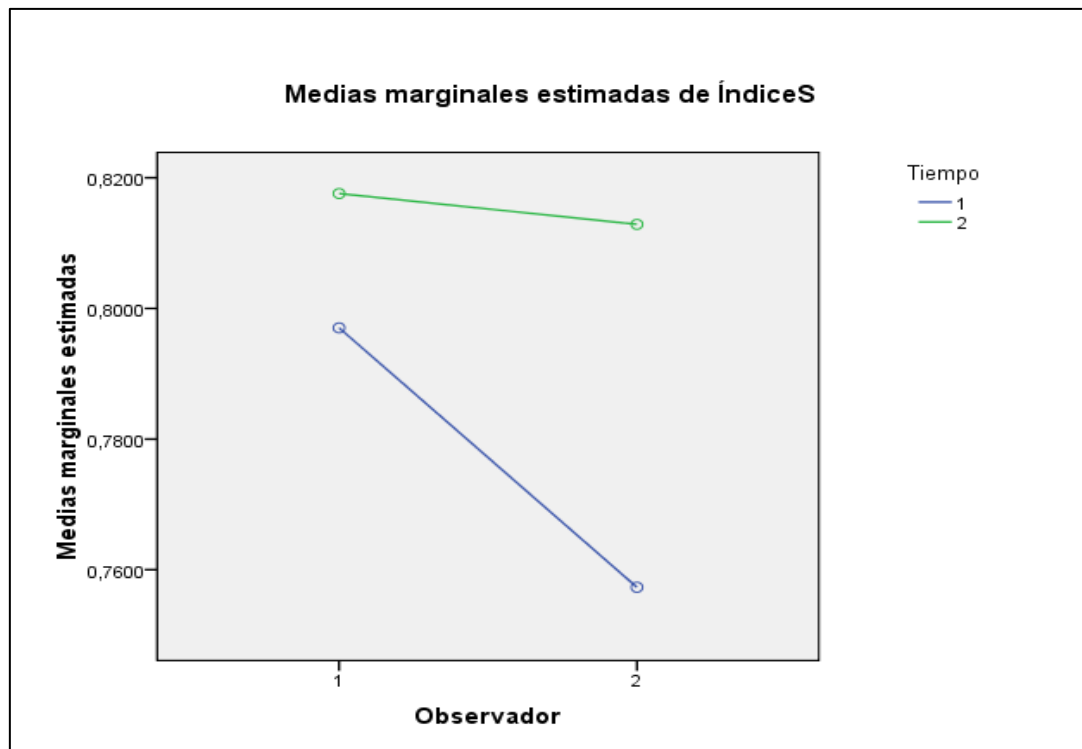
### **1.b. Estudio comparativo entre el instante basal y en instante final:**

A los 6 meses se registraron mediciones significativamente más elevadas que en el período basal.

### **1.c. Estudio de la interacción observador-tiempo:**

En el período basal se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los observadores ( $p=0<0,001$ ), mientras que a los 6 meses ya no se detectaron tales diferencias ( $p=0,87$ ).

Para los dos observadores se detectaron diferencias significativas entre el período basal y los 6 meses ( $p=0$ ) (Fig. 32).



**Figura 32:** Comparación entre las medidas de ambos observadores con el índice *Snake* en el instante basal y en el instante final. Se observa que la medición final es en ambos casos más alta que la medición basal.

## **2. Índice lineal:**

Hay un efecto significativo del observador, del tiempo y de la interacción observador-tiempo ( $p=0$ ).

### **2.a. Estudio comparativo entre ambos observadores:**

El observador 1 proporcionó mediciones significativamente más elevadas que el observador 2.

### **2.b. Estudio comparativo entre el instante basal y en instante final:**

A los 6 meses se registraron mediciones significativamente más elevadas que en el período basal.

### **2.c. Estudio de la interacción observador-tiempo:**

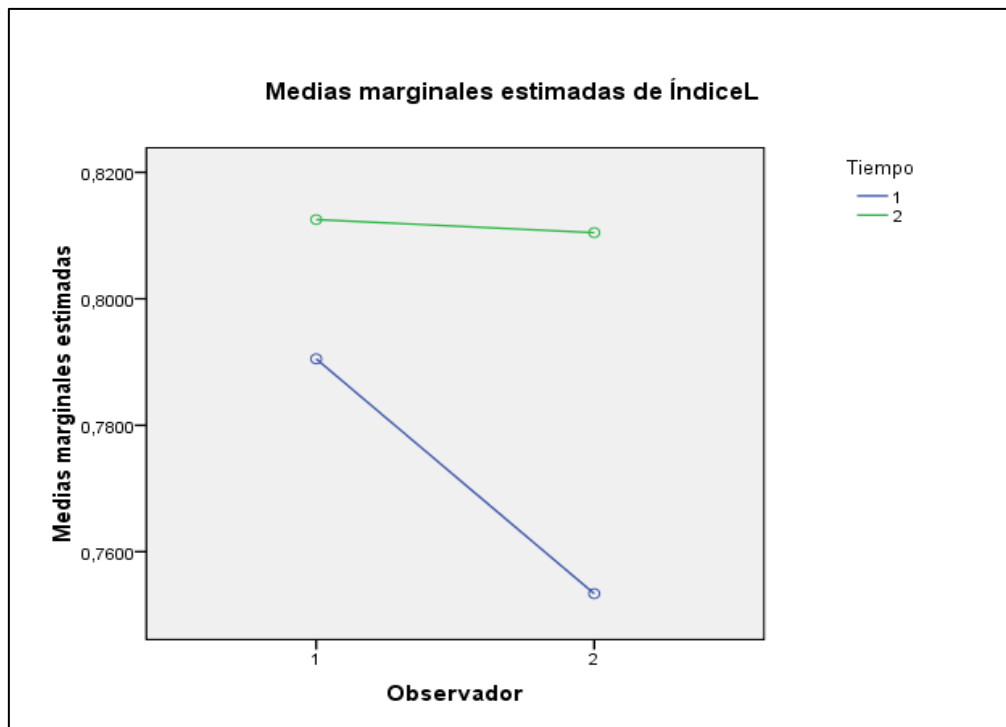
En el período basal se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los observadores ( $p=0<0,001$ ), mientras que a los 6 meses ya no se detectaron tales diferencias ( $p=0,609$ ).

Hay un efecto significativo del observador, del tiempo y de la interacción observador-tiempo ( $p=0$ ).

Al igual que con el Índice S, el observador 1 obtuvo mediciones más elevadas. A los 6 meses se registraron mediciones más elevadas, con ambos observadores, que en el período basal. En el período basal se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los observadores ( $p=0$ ), pero no a los 6 meses ( $p=0,609$ ).

Para los dos observadores se detectaron diferencias significativas entre el período basal y los 6 meses ( $p=0$ ) (Fig. 33).

Por tanto se obtuvieron exactamente las mismas conclusiones para ambos índices.



**Figura 33:** Comparación entre las medidas de ambos observadores con el índice lineal en el instante basal y en el instante final. Se observa que la medición final es siempre más alta que la medición basal.

### 3. Índices lineal y *Snake*:

En las mediciones hubo un efecto significativo del índice, del observador, del tiempo y de la interacción observador-tiempo ( $p=0<0,001$ ).

Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas considerando las interacciones índice-observador ( $p=0,085$ ), índice-tiempo ( $p=0,269$ ) e índice-observador-tiempo ( $p=0,888$ ).

#### 3.a. Efecto (individual) del índice:

Se detectaron diferencias significativas entre los índices lineal y *Snake*, donde el índice *Snake* proporcionó mediciones más elevadas ( $p=0$ )

#### 3.b. Efecto (individual) del observador:

Se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los observadores, de forma que el observador 1 anotó mediciones más elevadas (Fig. 34).

#### 3.c. Efecto (individual) del tiempo:

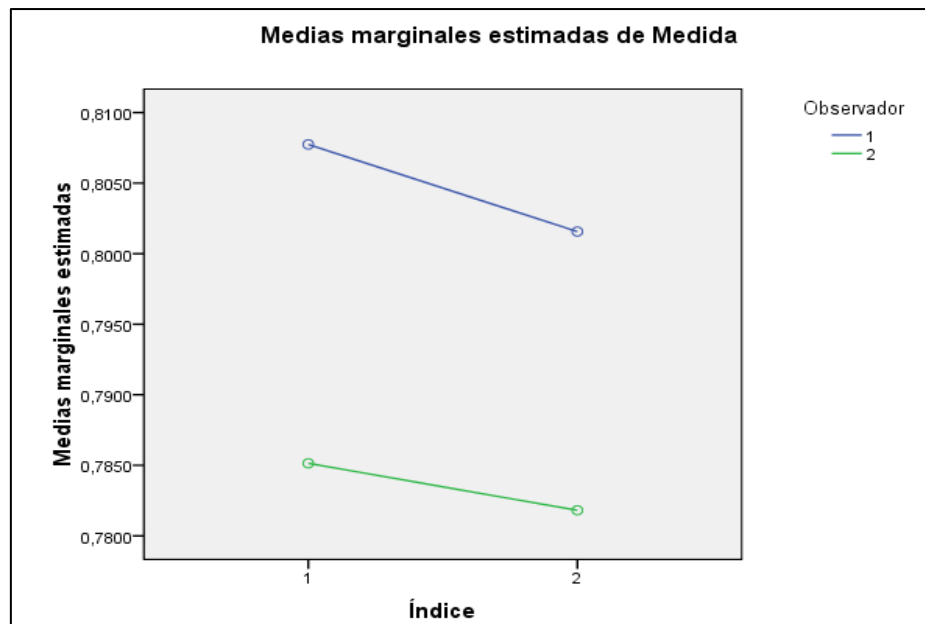
Se registraron diferencias entre el período basal y a los 6 meses donde las mediciones fueron más elevadas ( $p=0$ ).

#### 3.d. Efecto interacción índice-observador:

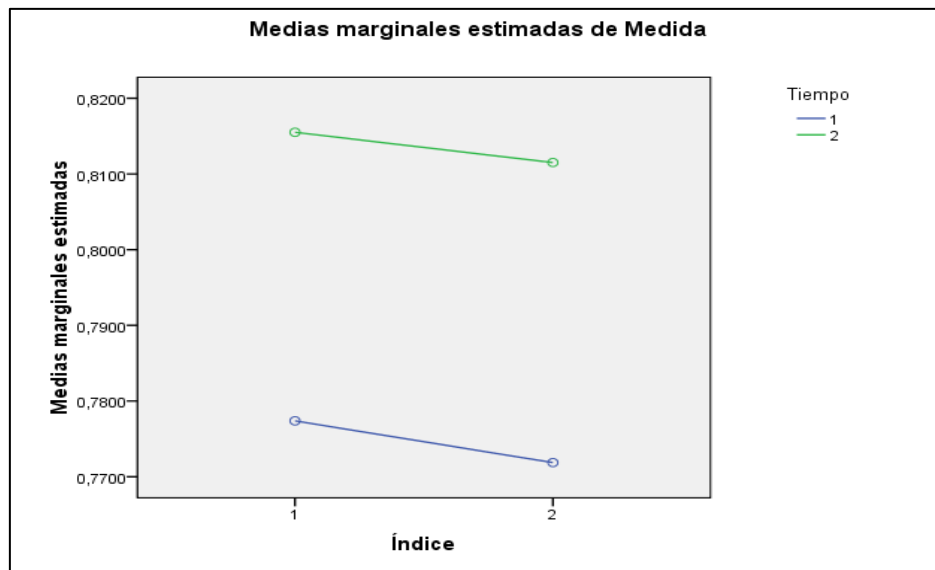
Para ambos observadores, se registraron diferencias entre los índices ( $p=0$ ), por lo que hubo un efecto del índice ya comentado anteriormente. (Fig. 34).

### 3.d. Efecto interacción índice-tiempo

En ambos períodos, tanto en el instante basal como a los 6 meses se registraron diferencias entre los dos índices ( $p=0$  y  $p=0,001$ , respectivamente) (Efecto del índice ya comentado) (Fig. 35).



**Figura 34:** Comparación entre las medidas de ambos observadores con ambos índices (Índice 1: Índice *Snake* e Índice 2: Índice lineal). Se observa que el observador 1 proporciona mediciones más altas que el observador 2.



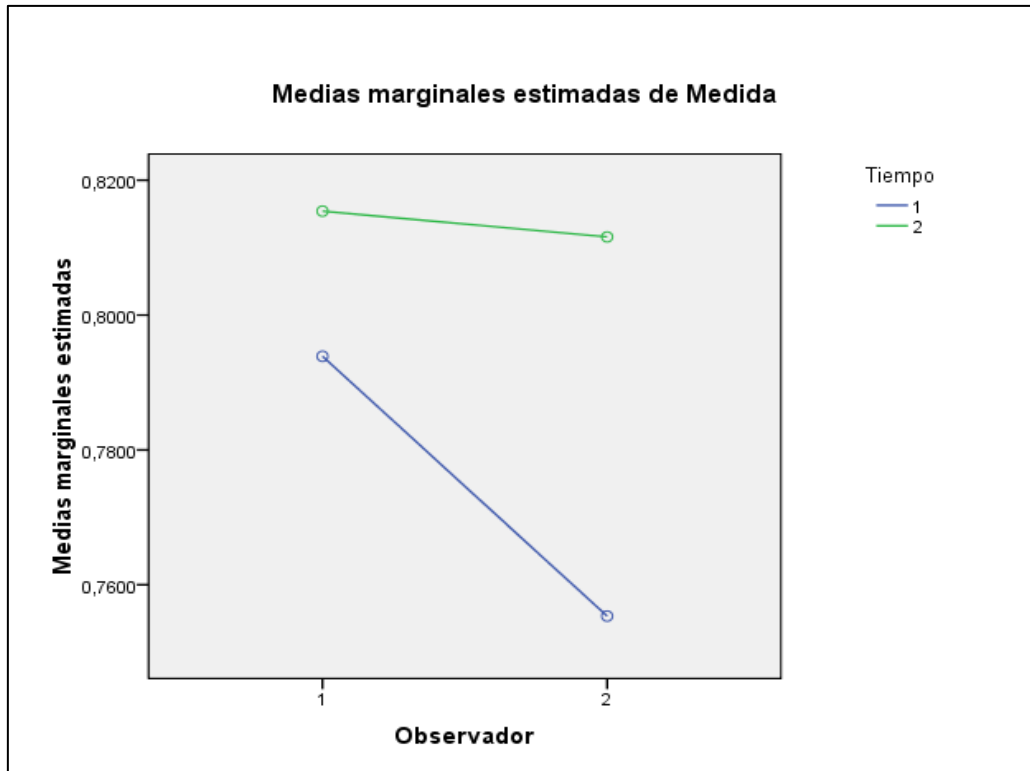
**Figura 35:** Comparación entre las medidas de ambos índices y de ambos tiempos (Índice 1: Índice *Snake* e Índice 2: Índice lineal). Se observa que la medición final es más alta que la basal.

### 3.e. Efecto interacción observador-tiempo:

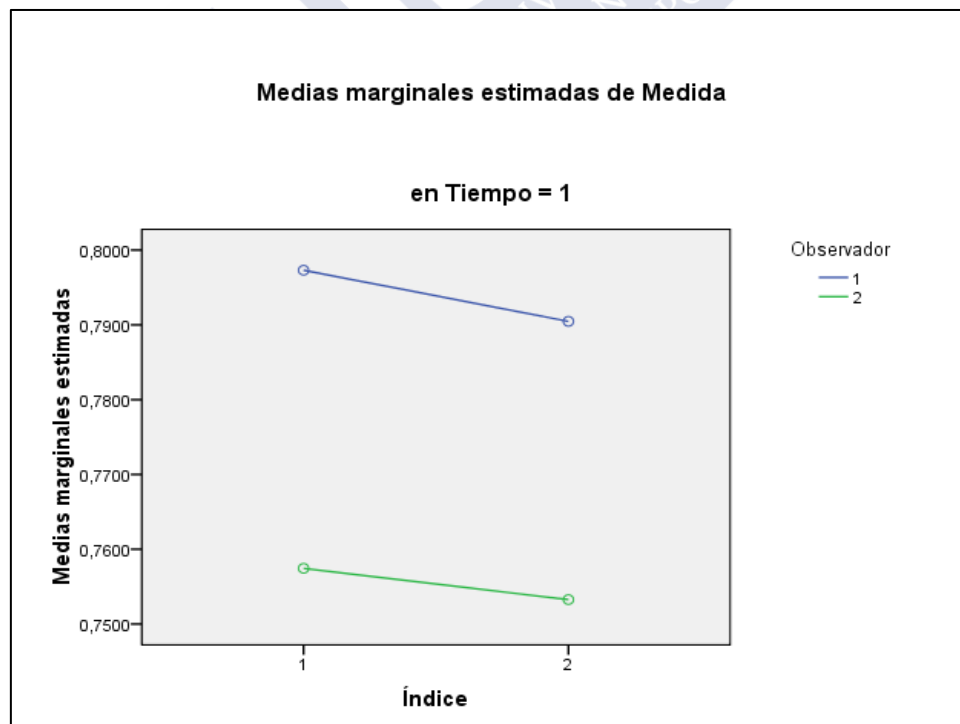
En el período basal se detectaron diferencias significativas entre ambos observadores ( $p=0$ ), pero no se detectaron tales diferencias a los 6 meses ( $p=0,294$ ). (Por tanto el tiempo influye de manera diferente en el observador, efecto significativo de la interacción) (Fig. 36).

### 3.f. Efecto interacción índice-observador-tiempo:

Para cada tiempo y cada observador se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos índices (Fig. 37 y 38).

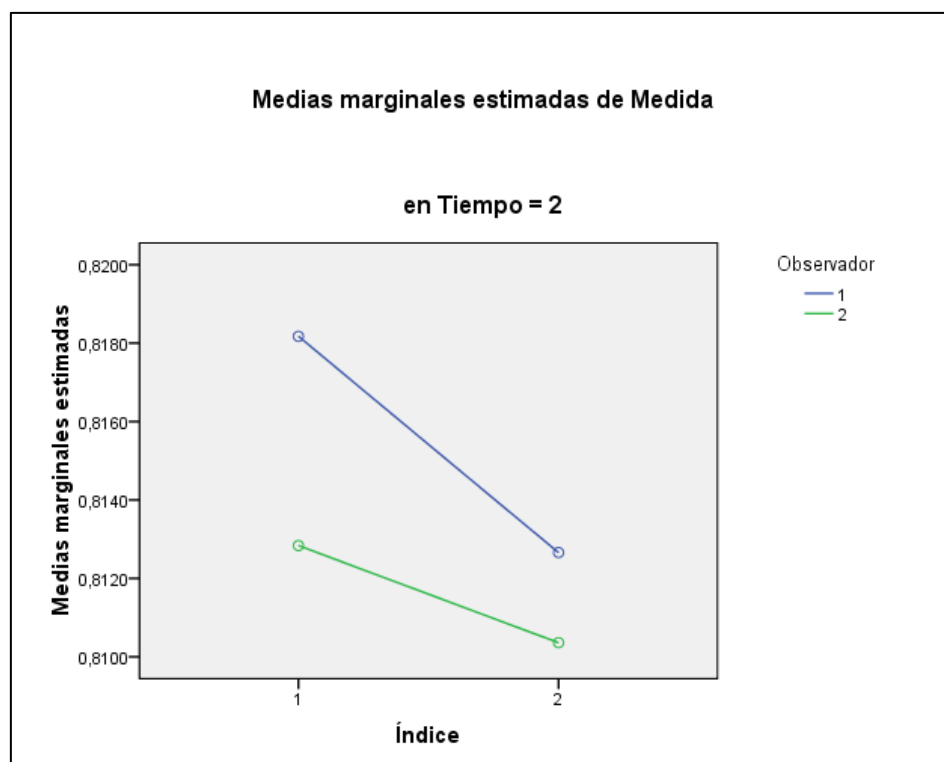


**Figura 36:** Comparación entre las medidas de ambos observadores en el instante basal y final. Se observa que la medición final es más alta que la basal.



**Figura 37:** Comparación entre las medidas de ambos observadores y ambos índices en el instante basal.

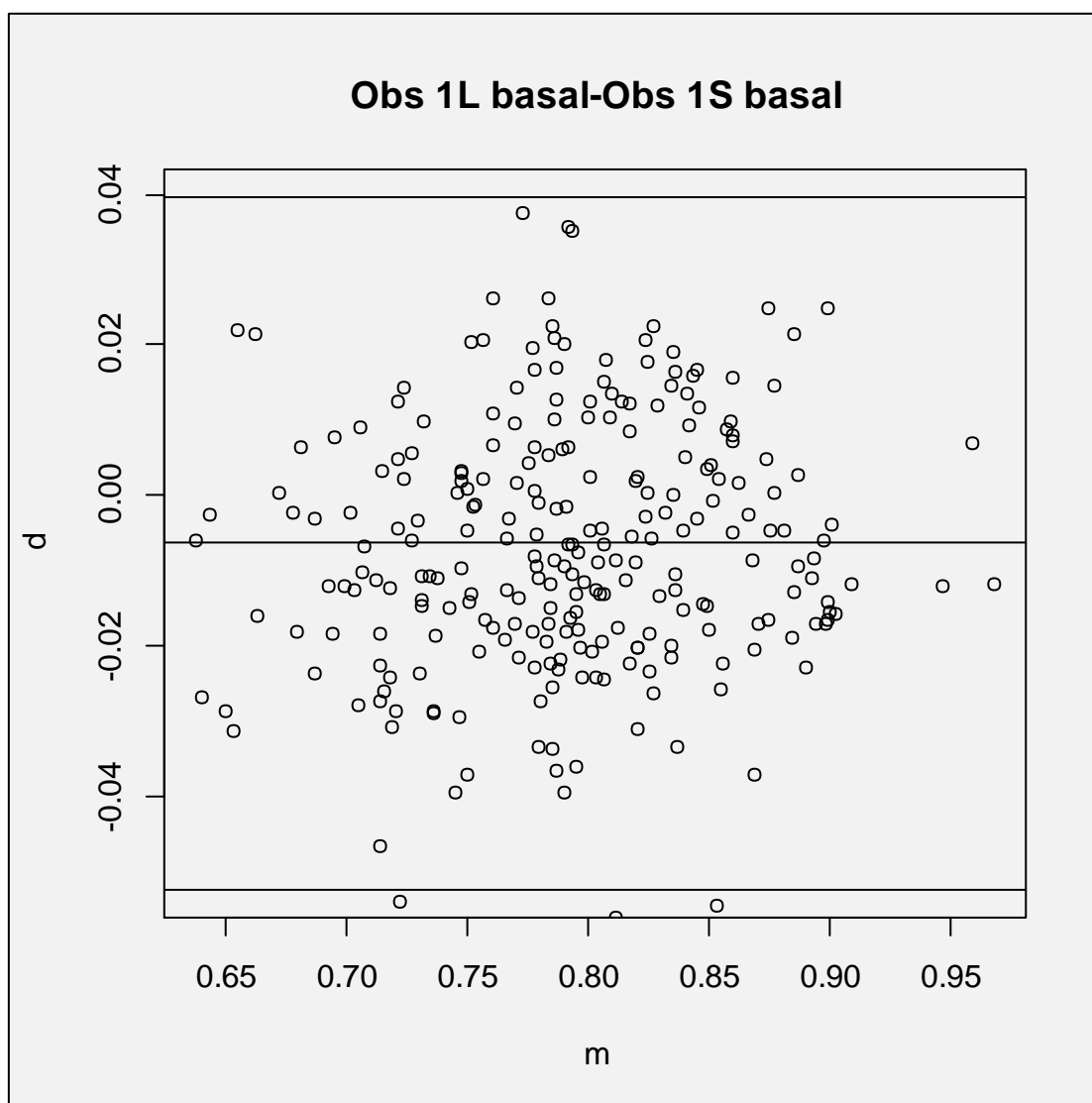




**Figura 38:** Comparación entre las medidas de ambos observadores y ambos índices en el instante final.

#### 4. Grado de acuerdo y correlación:

##### 4.a. Comparación de los dos índices, lineal y *Snake*, en el instante basal realizando las mediciones el observador 1:



**Figura 39:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el índice lineal basal y el *Snake* basal en el observador 1. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El observador 1 en el instante basal para el índice lineal proporcionó mediciones 0,0524 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,0396 unidades por

encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango.

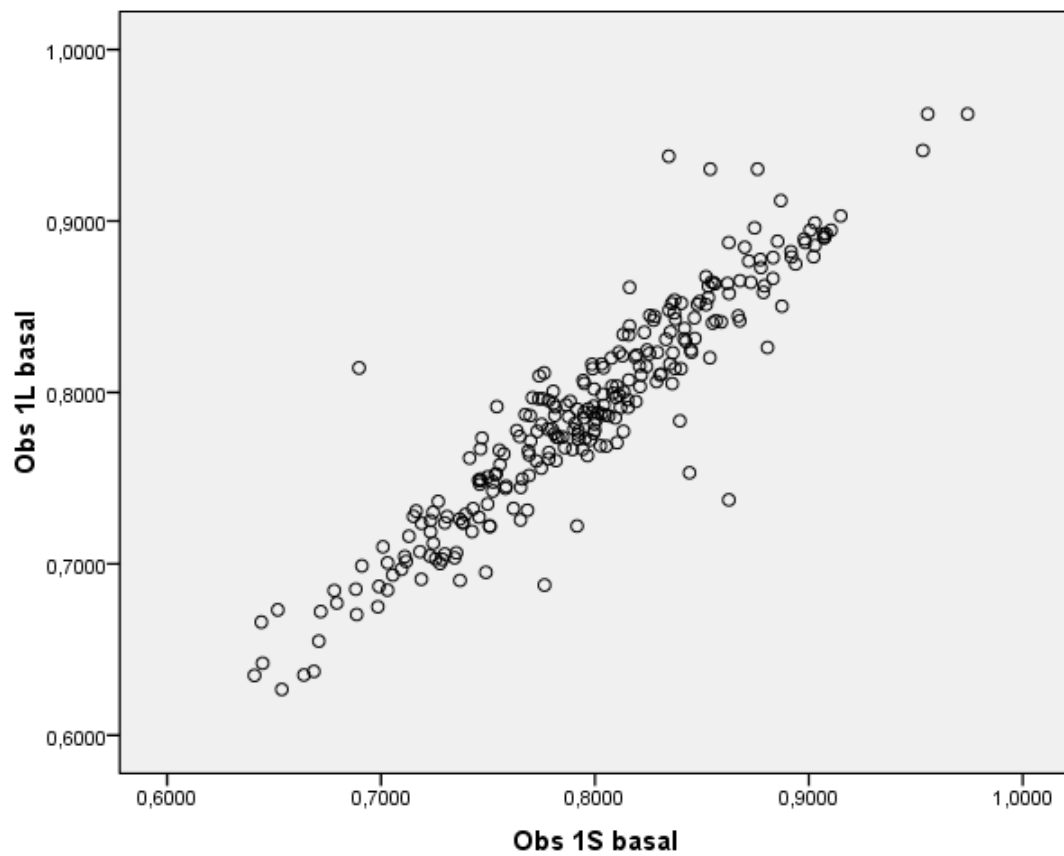
Si se calculan índices numéricos que miden la consistencia/acuerdo/fiabilidad entre los dos índices, como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes entre los métodos, se obtuvo un valor de 0,93. Por tanto, puede decirse que se observó una elevada consistencia/fiabilidad/acuerdo entre las mediciones de ambos índices realizadas por el observador 1.

Se observó una buena correlación lineal entre ambos índices en el momento basal cuando realizó las observaciones el observador 1, obteniéndose un coeficiente de correlación de Pearson igual a 0,933 (Tabla 19, Fig. 40).

	Observador 1L basal	Observador 1S basal
Observador 1L basal	1	0,933
Observador 1S basal	0,933	1

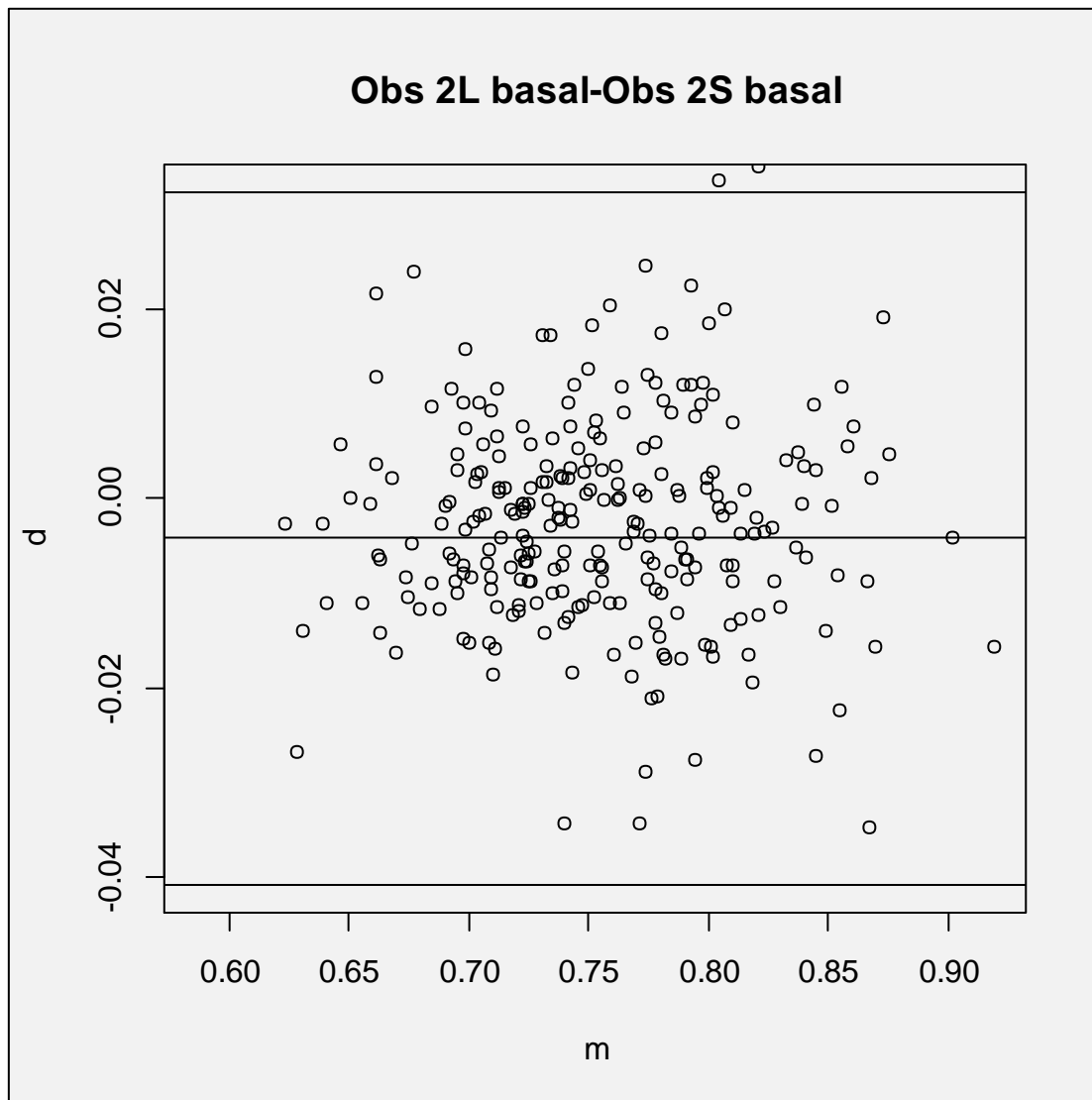
La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

**Tabla 19:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías por el observador 1 en el instante basal.



**Figura 40:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas por el observador 1 en tiempo basal realizadas sobre la misma fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake*.

**4.b. Comparación de los dos índices, lineal y *Snake*, en el instante basal realizando las mediciones el observador 2:**



**Figura 41:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el índice lineal y *Snake* en el instante basal en el observador 2. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El observador 2 en el instante basal para el índice lineal proporcionó mediciones 0,0408 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,323 unidades por encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango.

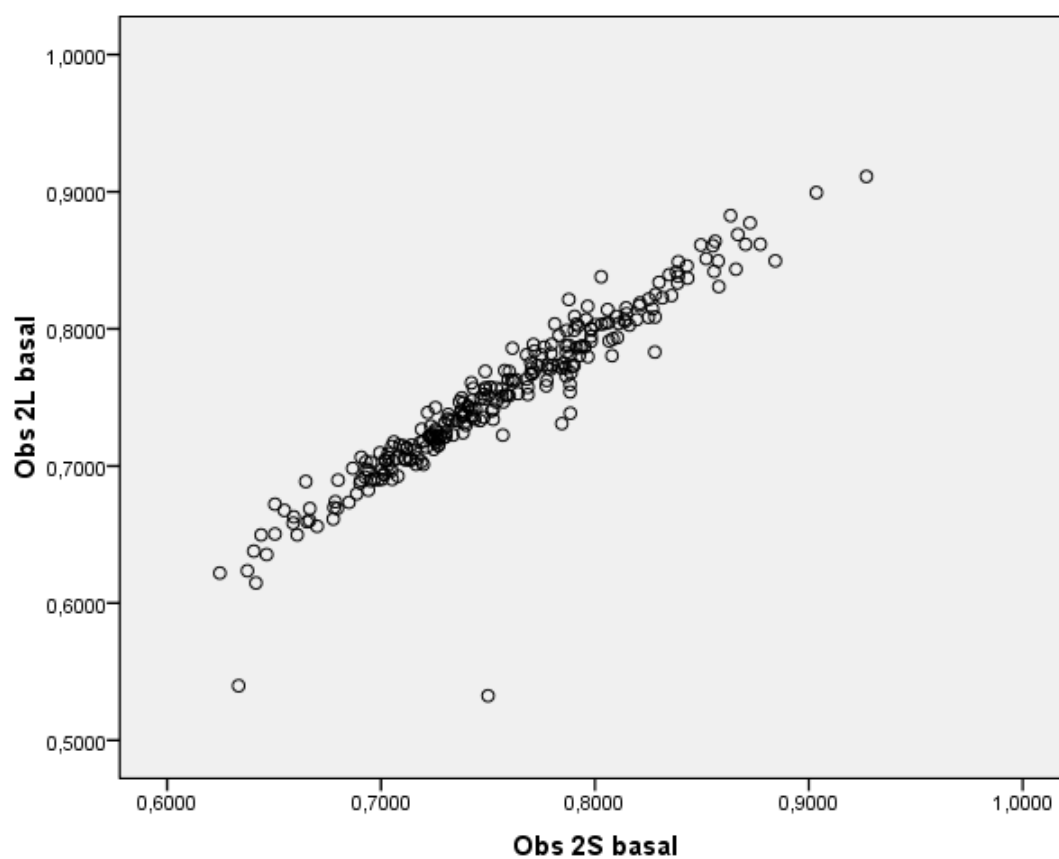
Si se calculan índices numéricos que miden la consistencia/acuerdo/fiabilidad entre los dos índices, como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes entre los métodos, se obtuvo un valor de 0,94. Por tanto, puede decirse que se observó una elevada consistencia/fiabilidad/acuerdo entre las mediciones de ambos índices realizadas por el observador 2.

Se observó una buena correlación lineal entre ambos índices en el momento basal cuando realizó las observaciones el observador 2, obteniéndose un coeficiente de correlación de Pearson igual a 0,947 (Tabla 20, Fig. 42).

	Observador 2L basal	Observador 2S basal
Observador 2L basal	1	0,947
Observador 2S basal	0,947	1

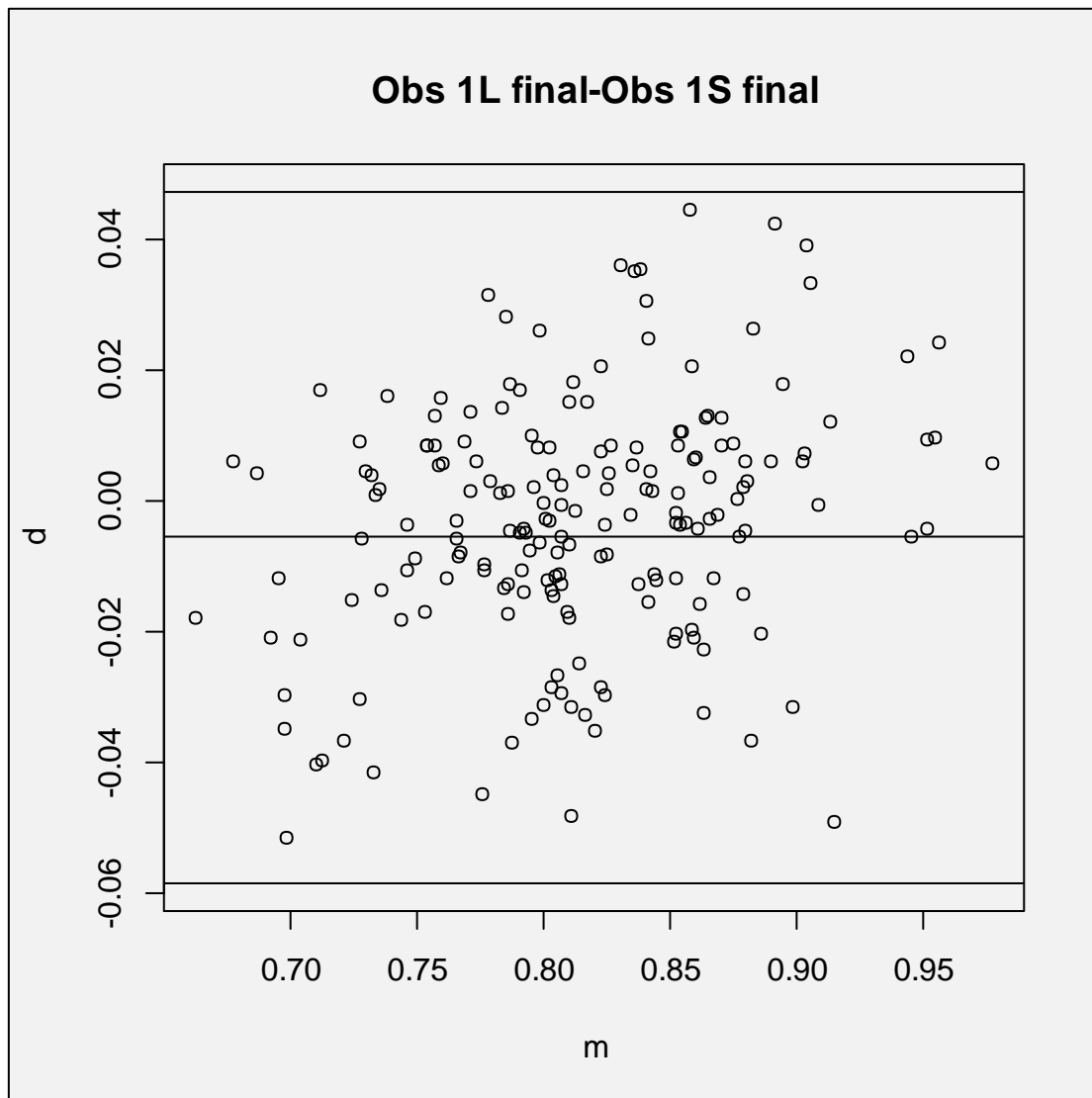
La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

**Tabla 20:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías por el observador 2 en el instante basal.



**Figura 42:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas por el observador 2 en tiempo basal realizadas sobre la misma fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake*.

#### 4.c. Comparación de los dos índices, lineal y *Snake*, a los 6 meses realizando las mediciones el observador 1:



**Figura 43:** Representación mediante gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con índice lineal y índice *Snake* en tiempos finales en el observador 1. Se observa en todos los gráficos buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El observador 1 a los 6 meses para el índice lineal proporcionó mediciones 0,0584 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,0471 unidades por encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango



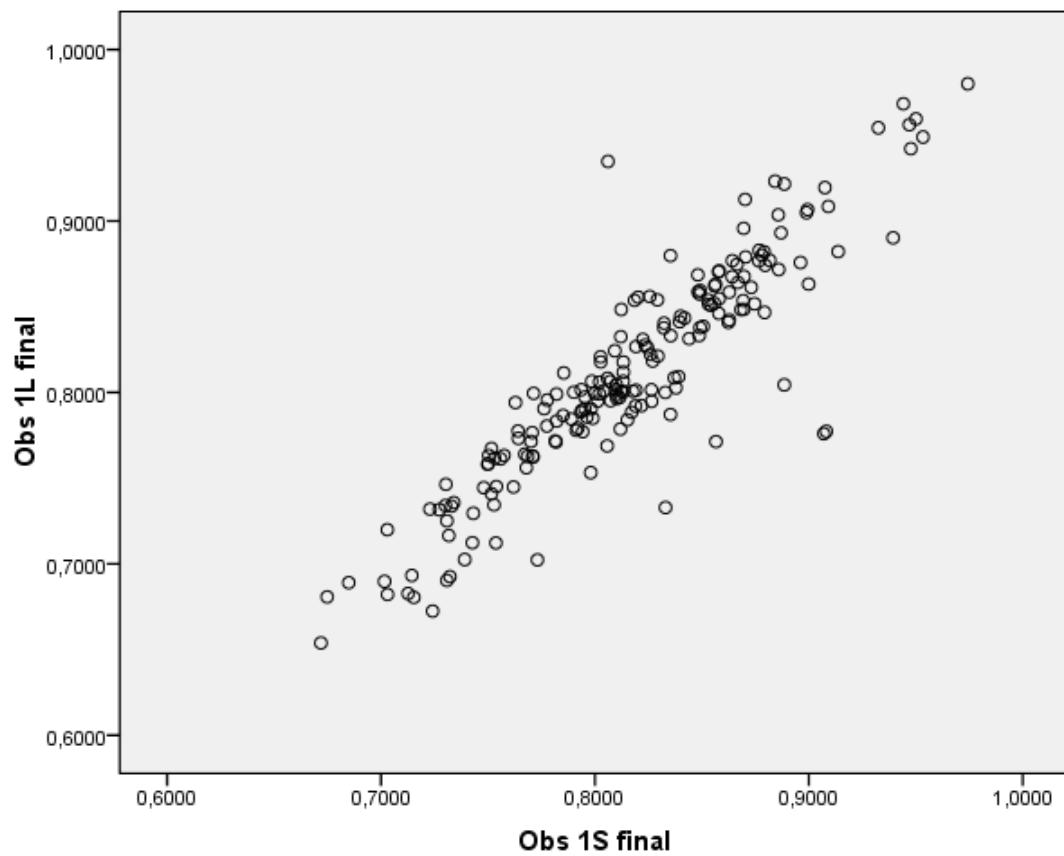
Si se calculan índices numéricos que miden la consistencia/acuerdo/validez entre los dos índices, como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes entre los métodos, se obtuvo un valor de 0,90. Por tanto, puede decirse que se observó una elevada consistencia/fiabilidad/acuerdo entre las mediciones de ambos índices realizadas por el observador 1.

Se observó una buena correlación lineal entre ambos índices a los 6 meses cuando realizó las observaciones el observador 1, obteniéndose un coeficiente de correlación de Pearson igual a 0,907 (Tabla 21, Fig. 44).

	Observador 1L final	Observador 1 final
Observador 1L final	1	0,907
Observador 1S final	0,907	1

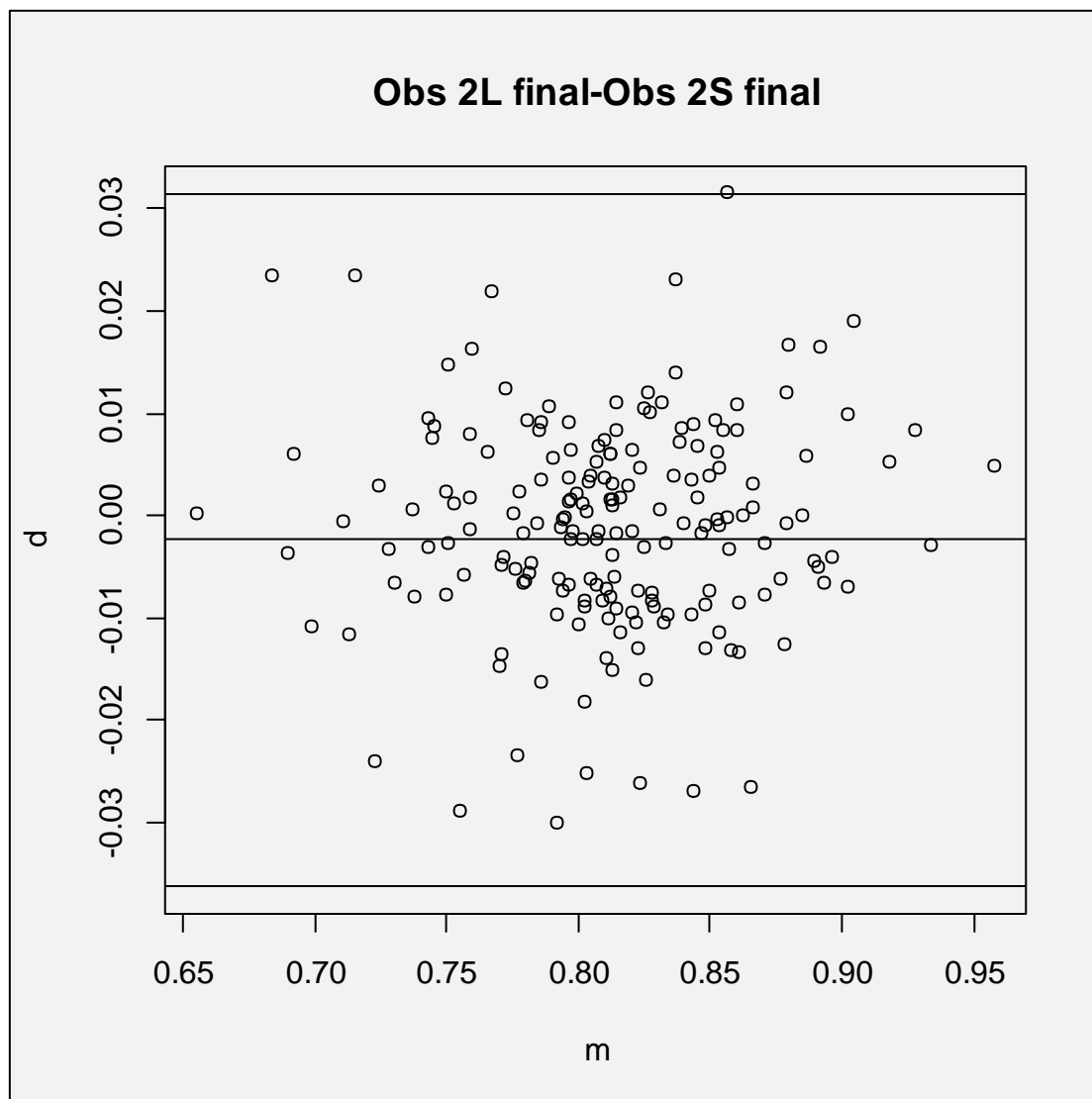
La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

**Tabla 21:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías por el observador 1 en el instante final.



**Figura 44:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas por el observador 1 en tiempo final realizadas sobre la misma fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake*.

#### 4.d. Comparación de los dos índices, lineal y *Snake*, a los 6 meses realizando las mediciones el observador 2:



**Figura 45:** Representación mediante gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con índice lineal e índice *Snake* en el instante final en el observador 2. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El observador 2 a los 6 meses para el índice lineal proporcionó mediciones 0,0361 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,0314 unidades por encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango.

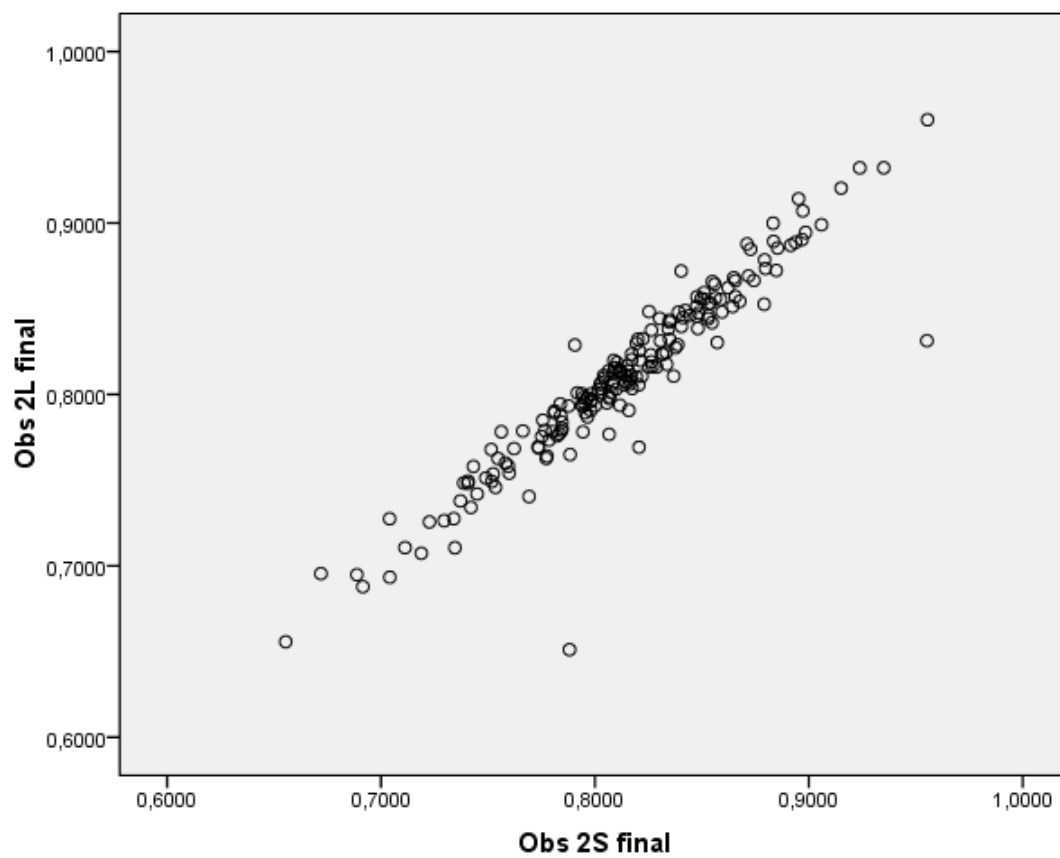
Si se calculan índices numéricos que miden la consistencia/acuerdo/validez entre los dos índices, como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff o la media de las correlaciones bivariantes entre los métodos, se obtuvo un valor de 0,94. Por tanto, puede decirse que se observó una elevada consistencia/fiabilidad/acuerdo entre las mediciones de ambos índices realizadas por el observador 2.

Se observó una buena correlación lineal entre ambos índices a los 6 meses cuando realizó las mediciones el observador 2, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson igual a 0,943 (Tabla 22, Fig. 46).

	Observador 2L final	Observador 2S final
Observador 2L final	1	0,943
Observador 2S final	0,943	1

La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

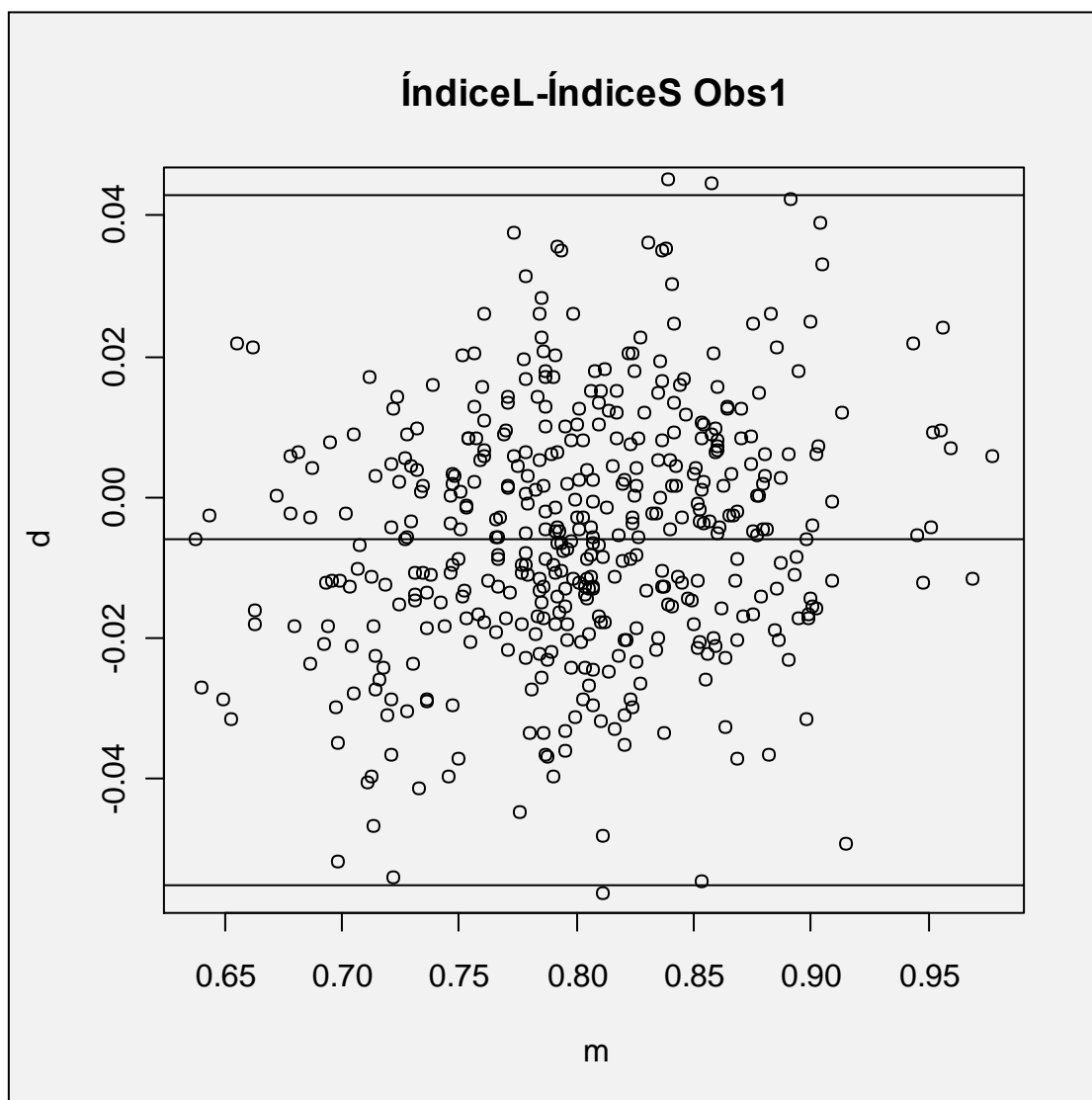
**Tabla 22:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías por el observador 2 en el instante final.



**Figura 46:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas por el observador 2 en tiempo final realizadas sobre la misma fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake*.

#### 4.e. Comparación/Grado de acuerdo de los dos índices lineal y *Snake* (independientemente del tiempo de las mediciones):

##### 4.e.1. Comparación entre los dos índices, lineal y *Snake*, realizando las mediciones el observador 1:



**Figura 47:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con índice lineal y índice *Snake* en el observador 1.

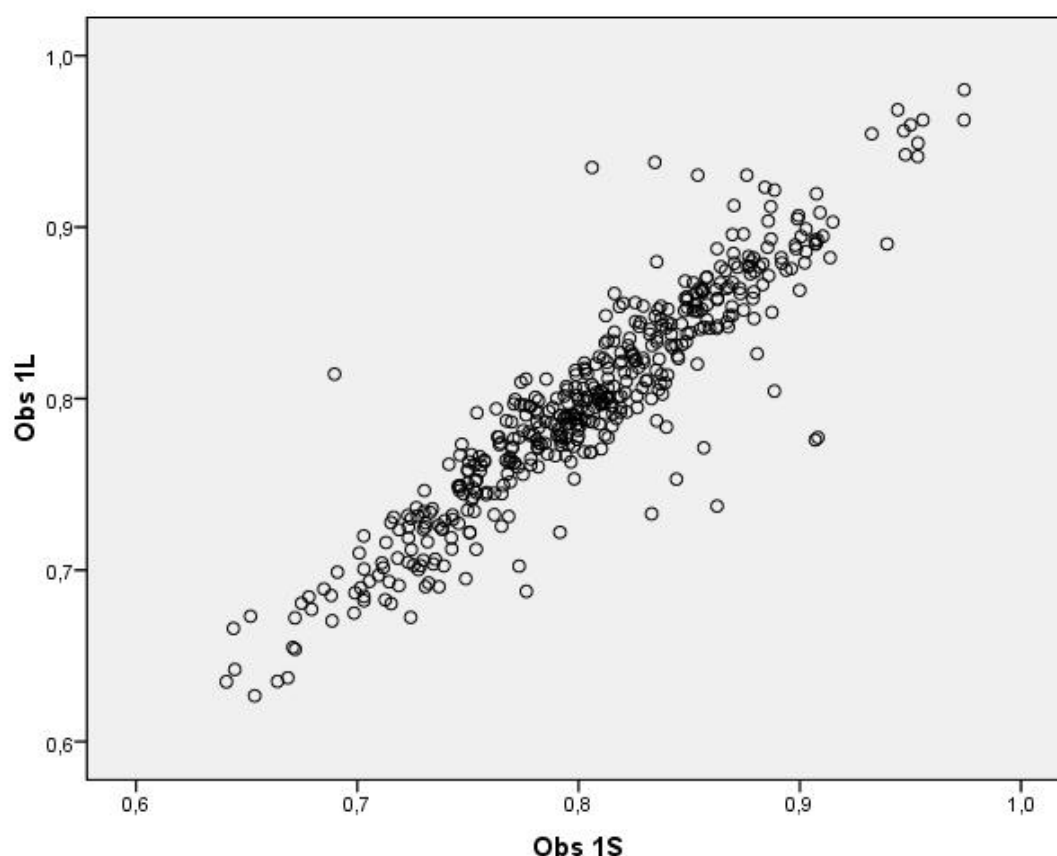
El observador 1 para el índice lineal proporcionó mediciones 0,055 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,0429 unidades por encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango .

Se observó una buena relación lineal entre los dos índices, independientemente del tiempo en el que el observador 1 realizó las mediciones, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson igual a 0.925 (Tabla 23, Fig. 48).

	Observador 1L	Observador 1S
Observador 1L	1	0,925
Observador 1S	0,925	1

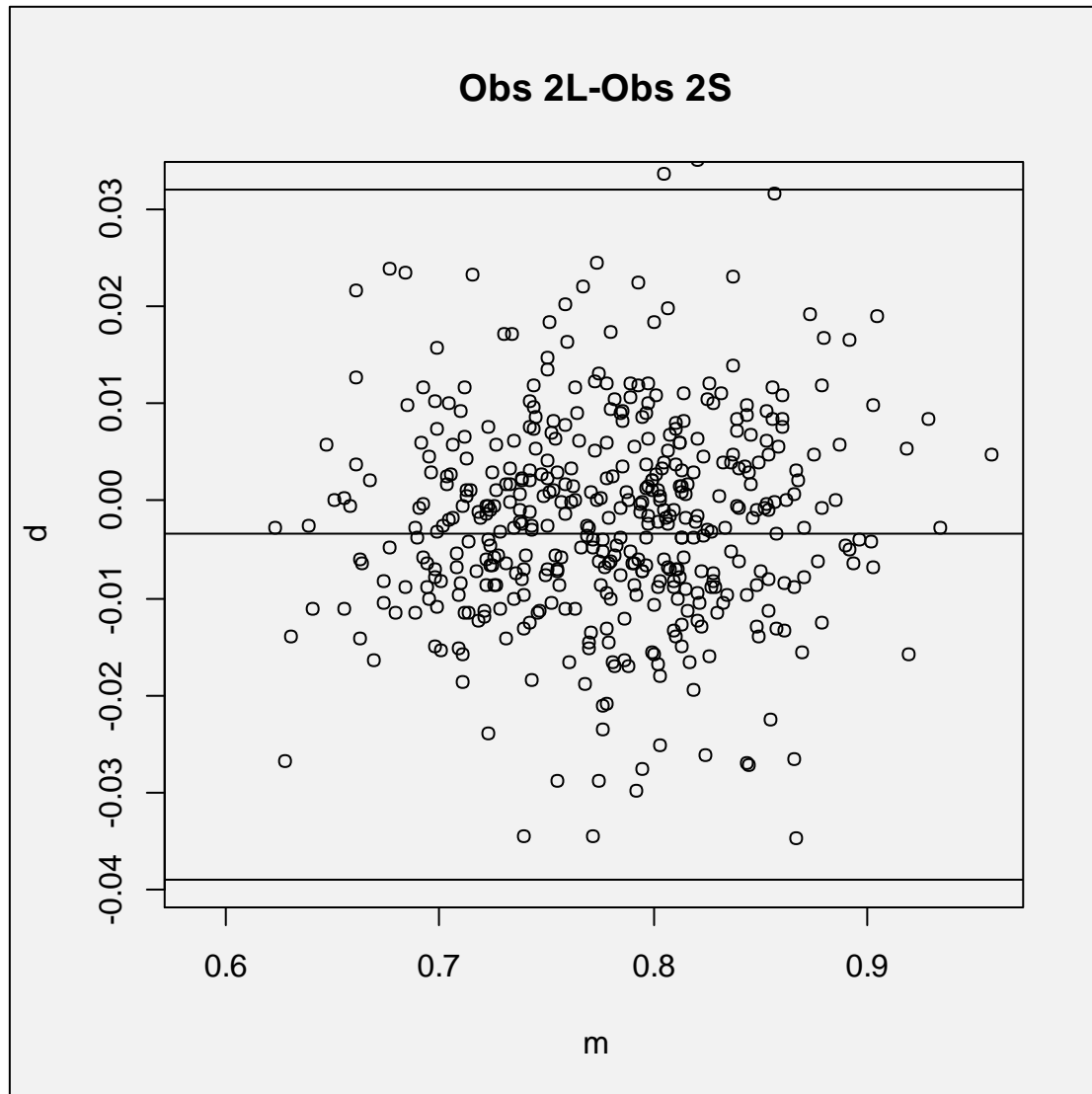
La correlación es significativa al nivel de 0,01 (bilateral)

**Tabla 23:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías por el observador 1.



**Figura 48:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas por el observador 1 sobre la misma fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake*

#### 4.e.2. Comparación entre los dos índices, lineal y *Snake*, realizando las mediciones el observador 2:



**Figura 49:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con índice lineal y índice *Snake* en el observador 2.

El observador 2 para el índice lineal proporcionó mediciones 0,0389 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,032 unidades por encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango .

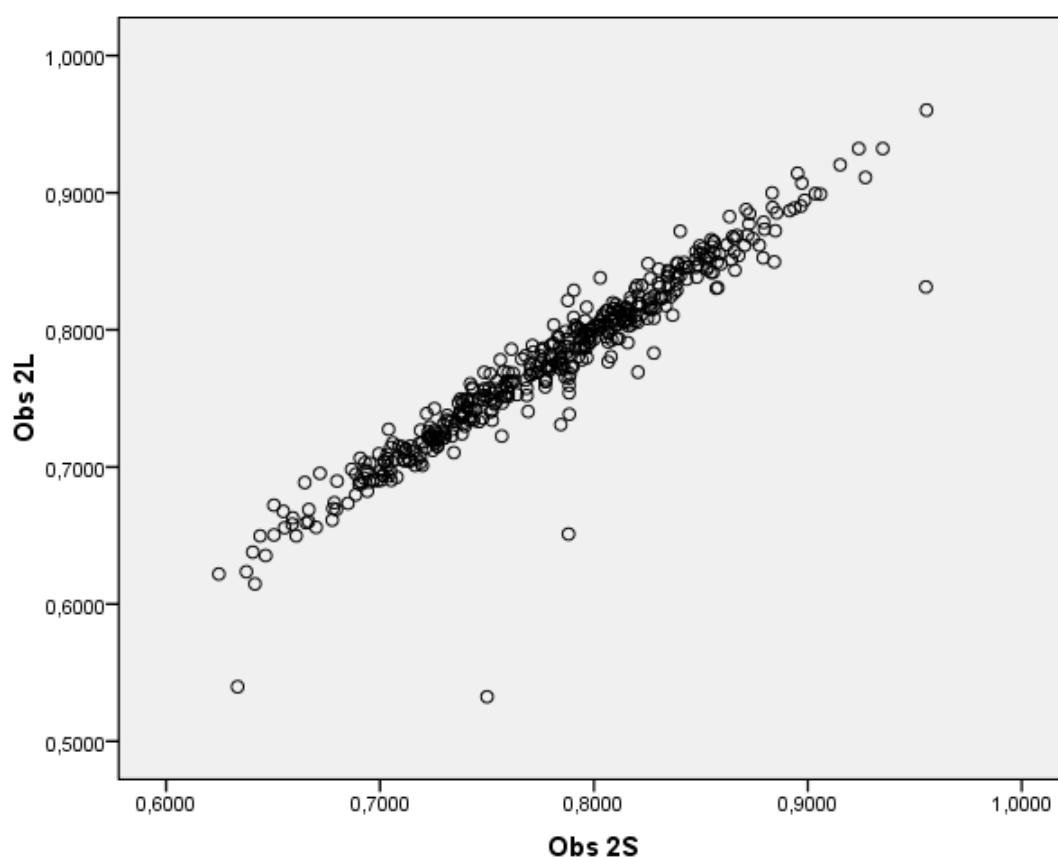


Se observó una buena relación lineal entre los dos índices, independientemente del tiempo en el que el observador 2 realizó las mediciones, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson igual a 0,958. (Tabla 24, Fig. 50).

	Observador 2L	Observador 2S
Observador 2L	1	0,958
Observador 2S	0,958	1

La correlación es significativa al nivel de 0,01 (bilateral)

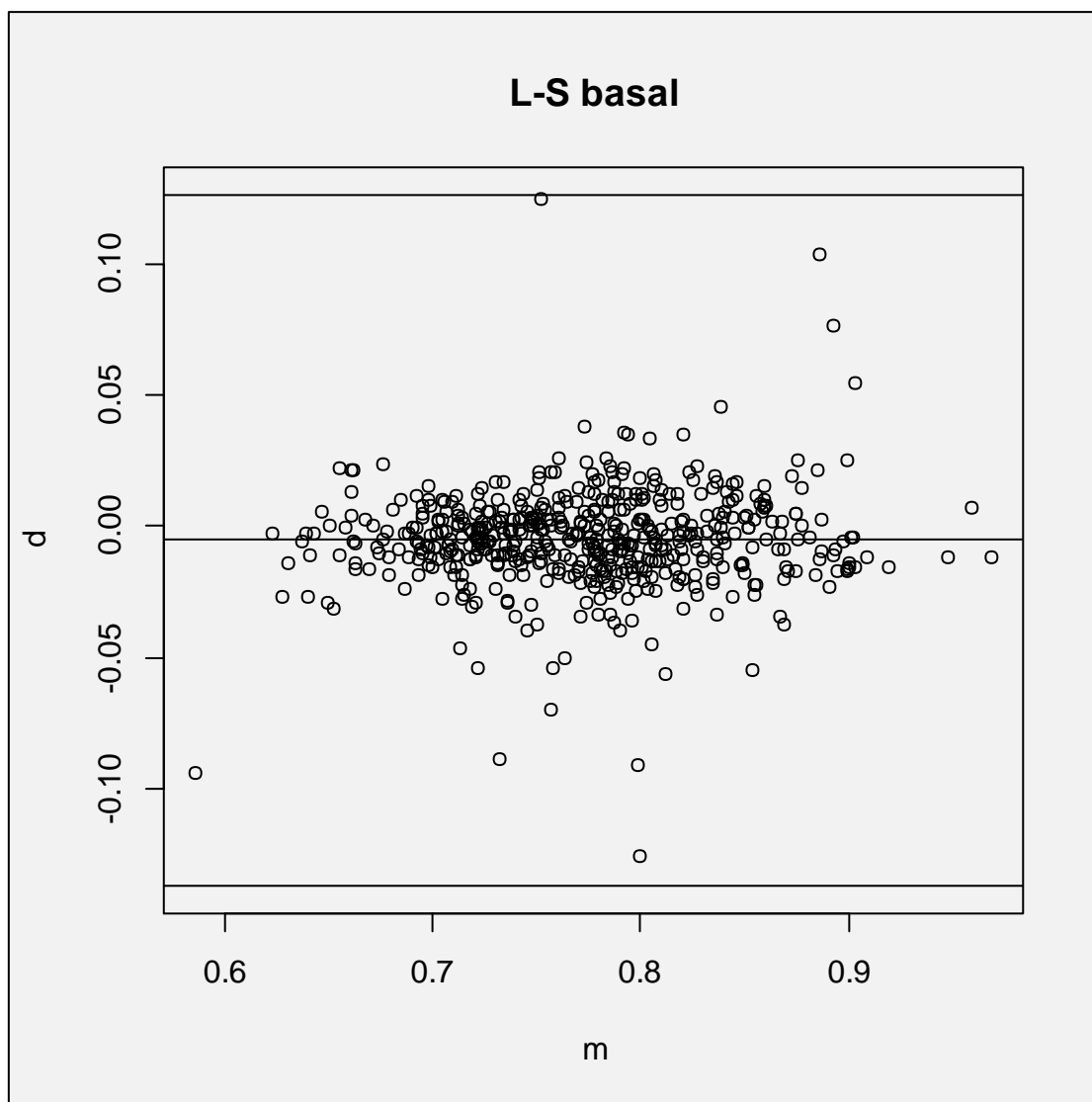
**Tabla 24:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías por el observador 2.



**Figura 50:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas por el observador 2 sobre la misma fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake*.

**4.f. Comparación/Grado de acuerdo de los dos índices, lineal y *Snake*, independientemente del observador que realiza las mediciones:**

**4.f.1. Comparación entre los dos índices, lineal y *Snake* en el instante basal:**



**Figura 51:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con índice lineal y índice *Snake* en el instante basal. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

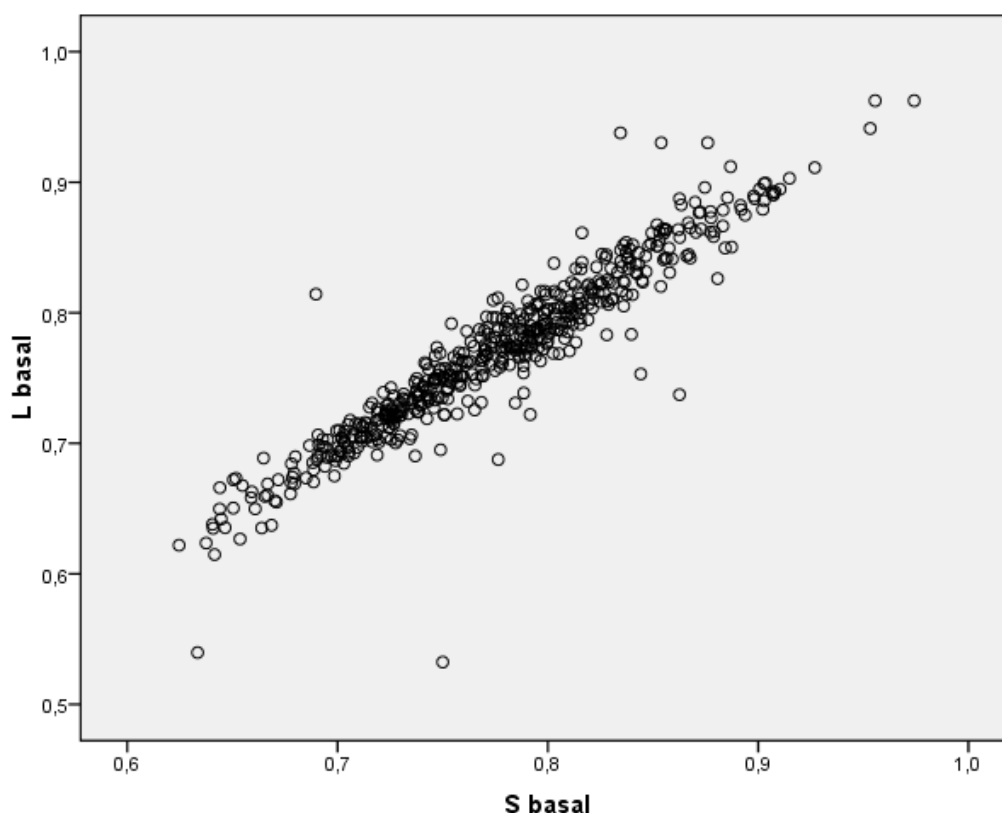
En el instante basal el índice lineal proporcionó mediciones 0,1365 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,1259 unidades por encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango .

Se observó una buena relación lineal entre los índices en el instante basal, independientemente del observador que realizó las mediciones, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson igual a 0,945 (Tabla 25, Fig. 52).

	Observador 1-2 L basal	Observador 1-2 S basal
Observador 1-2 L basal	1	0,945
Observador 1-2 S basal	0,945	1

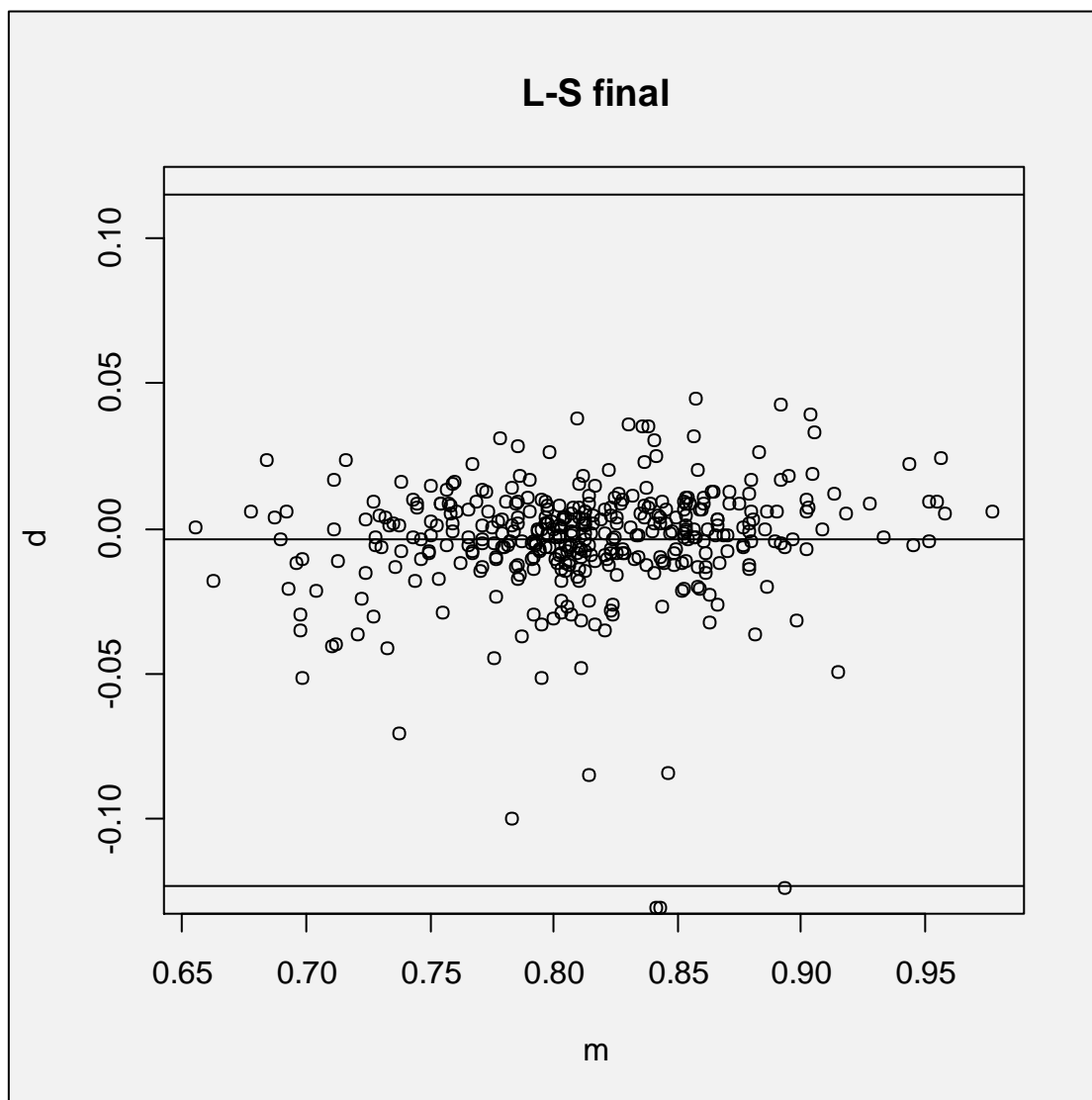
La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

**Tabla 25:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías en el instante basal.



**Figura 52:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre las mismas fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake* en el instante basal.

#### 4.f.2. Comparación entre los dos índices, lineal y *Snake*, a los 6 meses:



**Figura 53:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido con índice lineal y índice *Snake* en el instante final. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

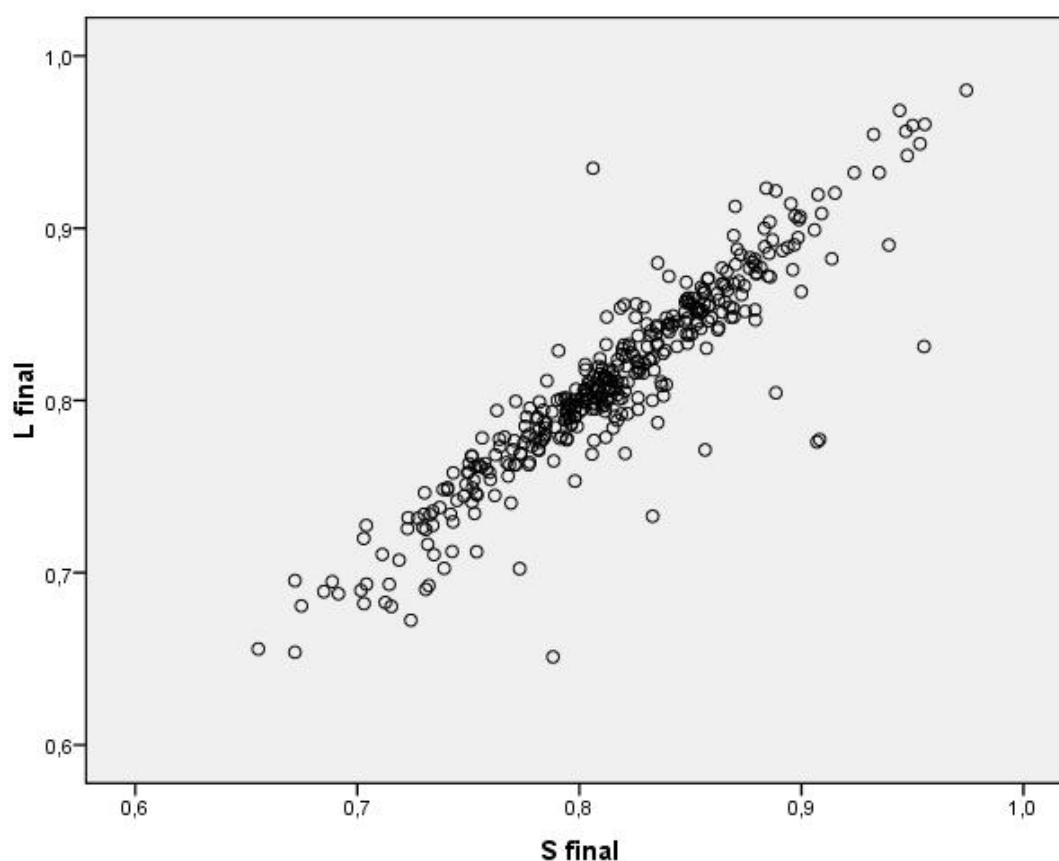
A los 6 meses, el índice lineal proporcionó mediciones 0,1231 unidades por debajo del índice *Snake* y 0,115 unidades por encima. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango.

Se observó una buena relación lineal entre los índices a los 6 meses, independientemente del observador que realizó las mediciones, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson igual a 0,921. (Tabla 26, Fig. 54).

	Observador 1-2 L final	Observador 1-2 S final
Observador 1-2 L final	1	0,921
Observador 1-2 S final	0,921	1

La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

**Tabla 26:** Correlación lineal de Pearson entre el método lineal y el método *Snake* realizado en las mismas retinografías en el instante final.



**Figura 54:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas mediante el método lineal y *Snake* en el instante final.

**4.g. Grado de acuerdo entre los dos observadores (independientemente del tiempo de las mediciones):**

Se muestra un mal grado de acuerdo entre ambos observadores y una correlación lineal moderada en ningún caso mayor del 0,6.



## **EXPERIMENTO 3: COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES FÓRMULAS Y TIEMPOS.**

Leyenda:

Fórmula de Cociente de Medias: C-M o Fórmula 1

Fórmula de Parr-Hubbard: P-H o Fórmula 2

Fórmula de Parr-Hubbard Revisada: P-H R o Fórmula 3

### **1. Diferencias entre las mediciones según la fórmula utilizada y el instante temporal analizado:**

Se detectó un efecto significativo de la fórmula, del tiempo y de la interacción fórmula-tiempo ( $p=0$ ) (Tabla 27).

#### **1.a. Efecto (individual) de la fórmula:**

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre Hubbard-Parr Revisado ( $p=0<0,001$ ) que proporcionó unas mediciones bastante más bajas y las otras dos fórmulas, pero no hubo diferencias entre Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr ( $p=0,118$ ).

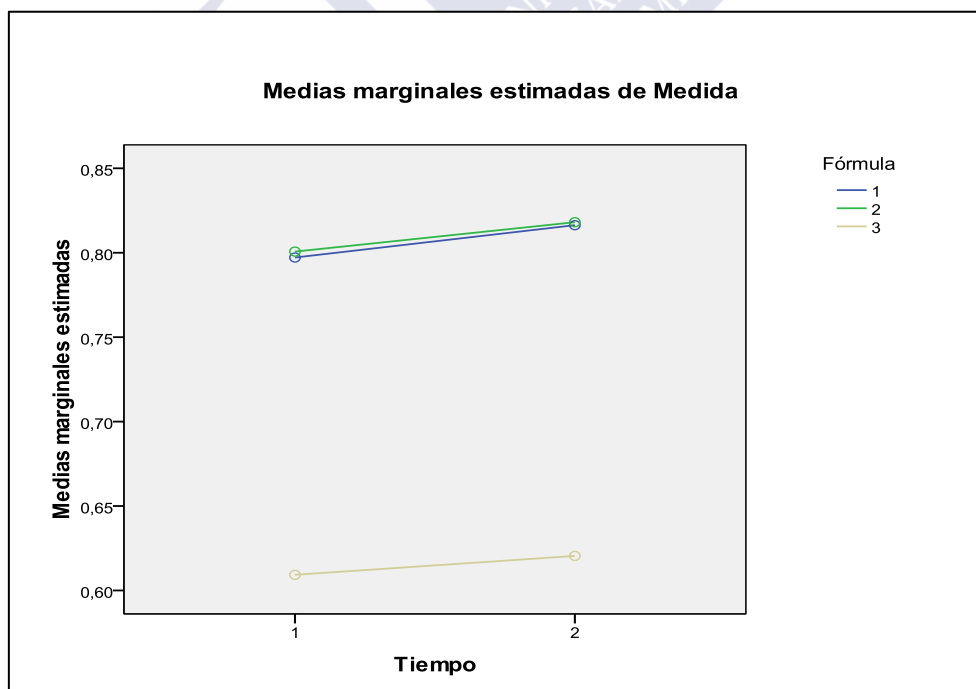
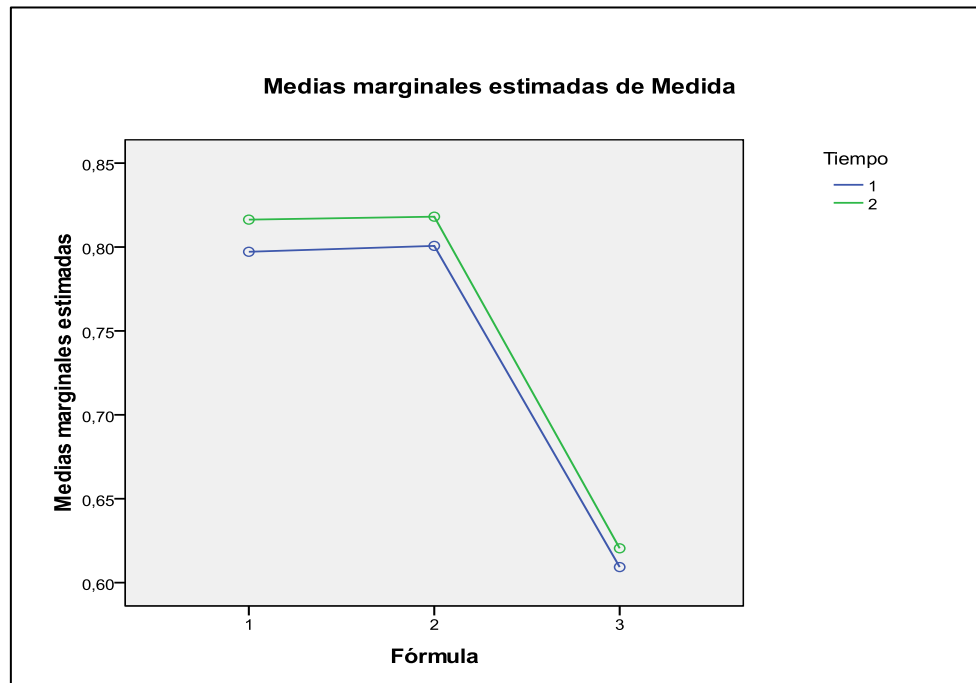
#### **1.b. Efecto (individual) del tiempo:**

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones en ambos instantes de tiempo ( $p=0$ ), de forma que las medidas fueron más elevadas a los 6 meses que en el instante basal.

#### **1.c. Efecto de la interacción fórmula-tiempo:**

Tanto en el instante basal como a los 6 meses se detectaron diferencias estadísticamente significativas con Hubbard-Parr Revisado ( $p=0$ ), pero no hubo diferencias entre Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr ( $p=0,129$  en el instante basal y  $p=0,675$  a los 6 meses) (Fig. 55 y 56).

Para todas las fórmulas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos instantes de tiempo (basal y 6 meses) ( $p=0$ ).



**Figuras 55 y 56:** Gráficos donde se muestran las mediciones con las 3 fórmulas tanto en los instantes basal como en el final. Se observa que el Hubbard- Parr Revisado obtiene valores más bajos que los demás.



	Media	Error Típico
<b>Cociente de medias Basal</b>	0,797	0,005
<b>Cociente de medias Final</b>	0,816	0,004
<b>Hubbard- Parr Basal</b>	0,801	0,005
<b>Hubbard- Parr Final</b>	0,818	0,005
<b>Hubbard- Parr Revisado Basal</b>	0,609	0,004
<b>Hubbard- Parr Revisado Final</b>	0,620	0,003

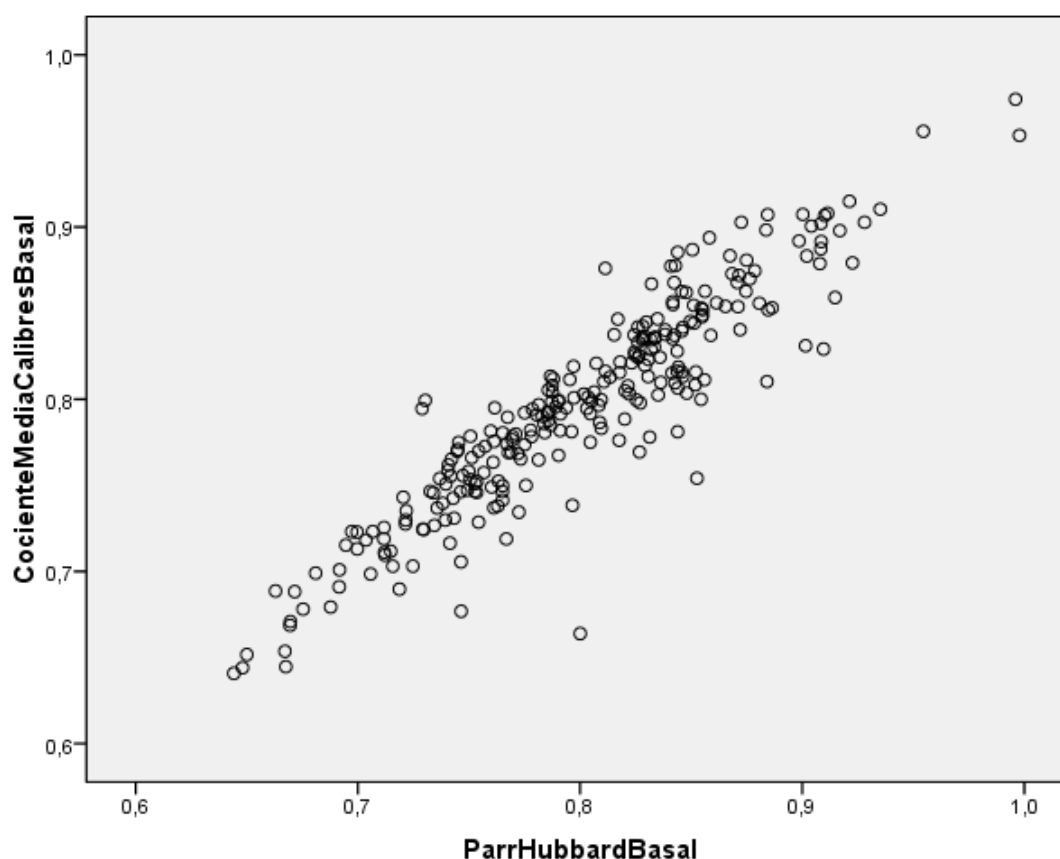
**Tabla 27:** Estudio descriptivo que muestra las medias obtenidas con las diferentes fórmulas en los diferentes instantes.

## 2. Correlaciones entre las diferentes fórmulas:

### 2.a. Instante basal:

#### 2.a.1. Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr en el instante Basal:

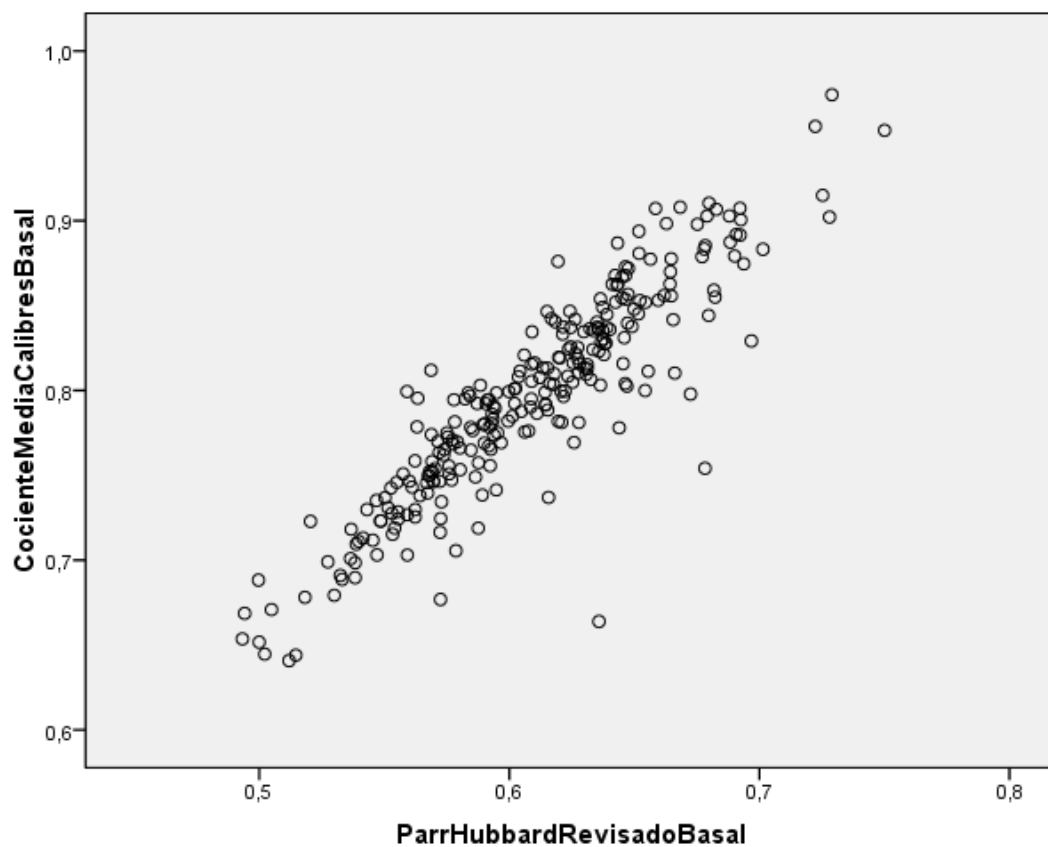
En el instante basal, se observó una muy buena relación lineal entre Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson significativo igual a 0,925 (Fig. 57, Tabla 28).



**Figura 57:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas en el instante basal mediante el método de cociente de medias de calibres y el método de Hubbard-Parr.

### 2.a.2. Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr Revisado en el instante Basal:

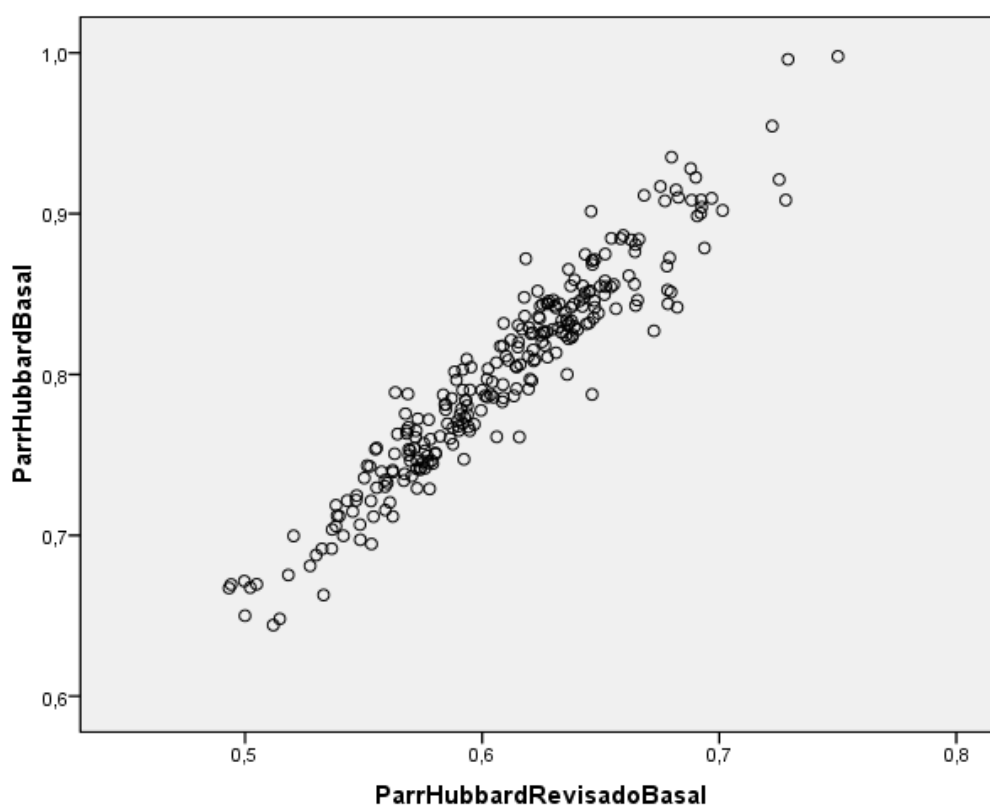
En el instante basal se observó una muy buena relación lineal entre el Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr Revisado, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson significativo igual a 0,905 (Fig. 58, Tabla 28).



**Figura 58:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas en el instante basal mediante el método de cociente de medias de calibres y el método de Hubbard-Parr Revisado.

### 2.a.3. Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado en el instante basal Basal:

En el instante basal se observó una muy buena relación lineal entre Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson significativo igual a 0,957 (Fig. 59, Tabla28).



**Figura 59:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas en el instante basal mediante el método de Hubbard-Parr y el método de Hubbard-Parr revisado.

Por tanto, en el instante basal, se observó una muy buena correlación entre las diferentes fórmulas, y la mayor correlación se obtuvo entre Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado

	Cociente media Calibres basal	Hubbard-Parr basal	Hubbard-Parr Revisado basal
Cociente media Calibres basal	1	0,925	0,905
Hubbard-Parr basal	0,925	1	0,957
Hubbard-Parr Revisado basal	0,905	0,957	1

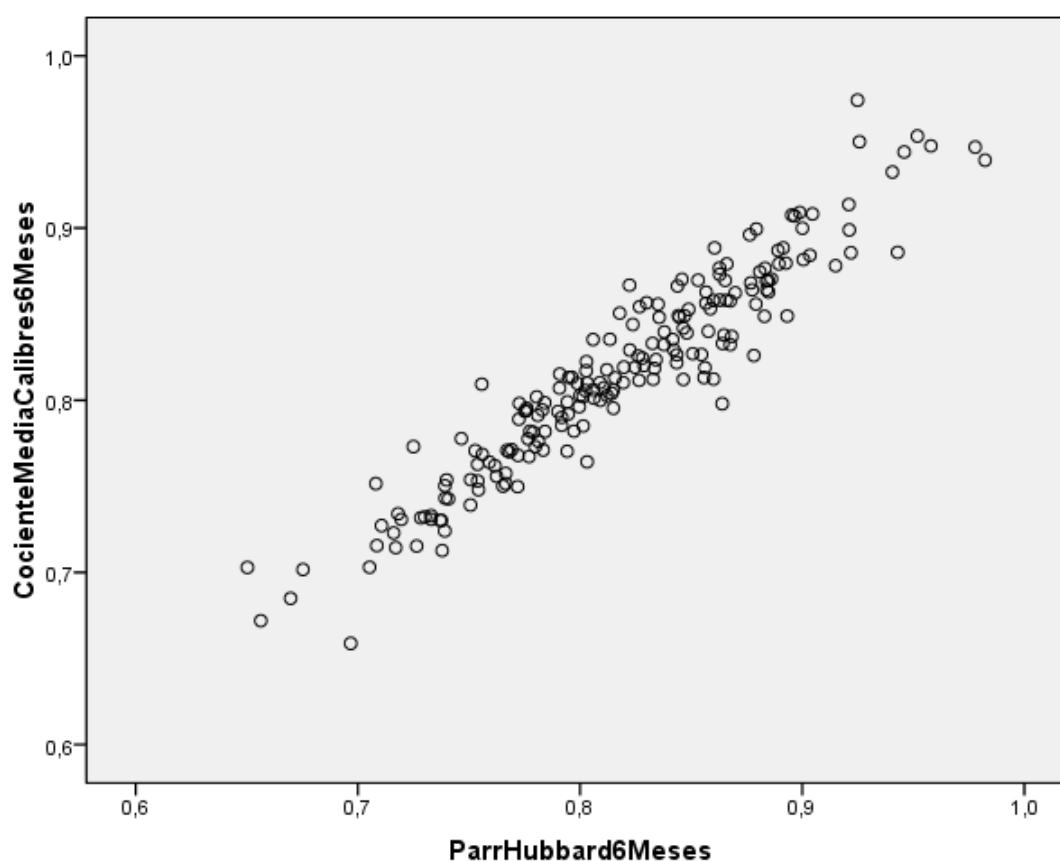
La correlación es significativa al nivel del 0,01 (bilateral)

**Tabla 28:** Correlación de Pearson entre los diferentes métodos de análisis de las mediciones estudiados en el instante basal

## 2.b. Correlación entre las diferentes fórmulas en el instante final:

### 2.b.1. Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr a los 6 meses:

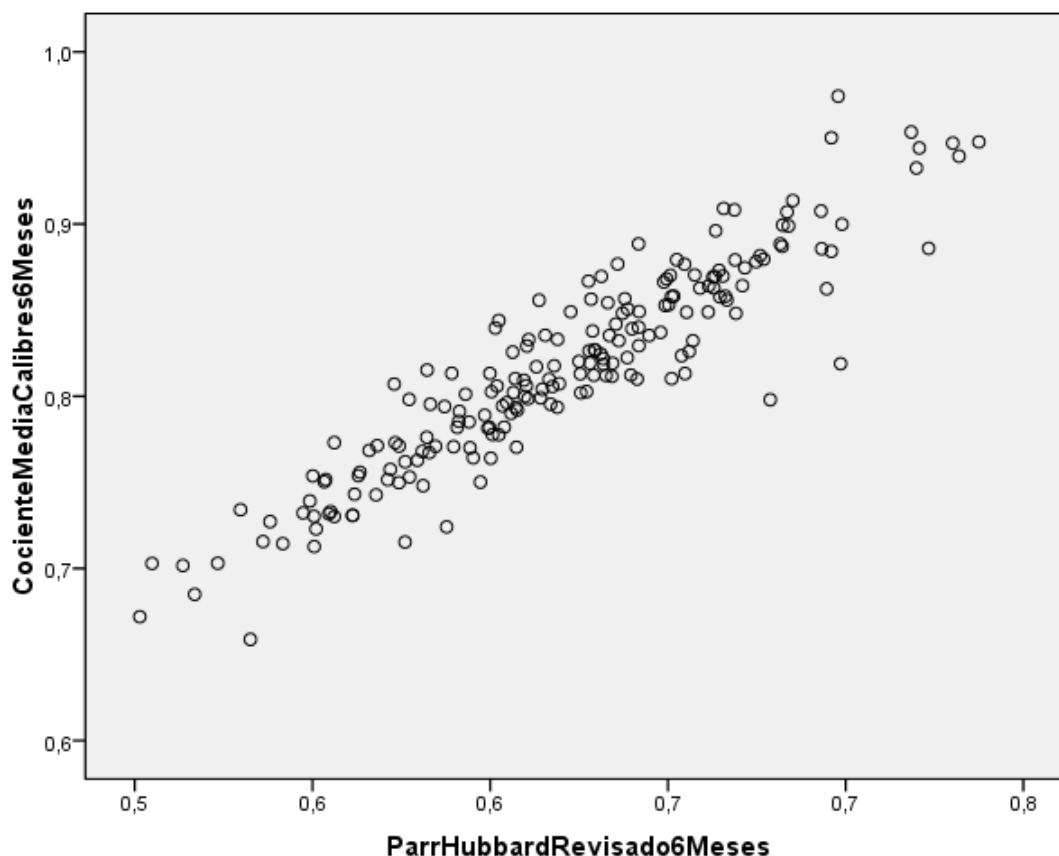
A los 6 meses, se observó una muy buena relación lineal entre Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson significativo igual a 0,95 (Fig. 60, Tabla 29).



**Figura 60:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas en el instante Final mediante el método de Cociente de medias y el método de Hubbard-Parr.

### 2.b.2. Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr Revisado a los 6 meses:

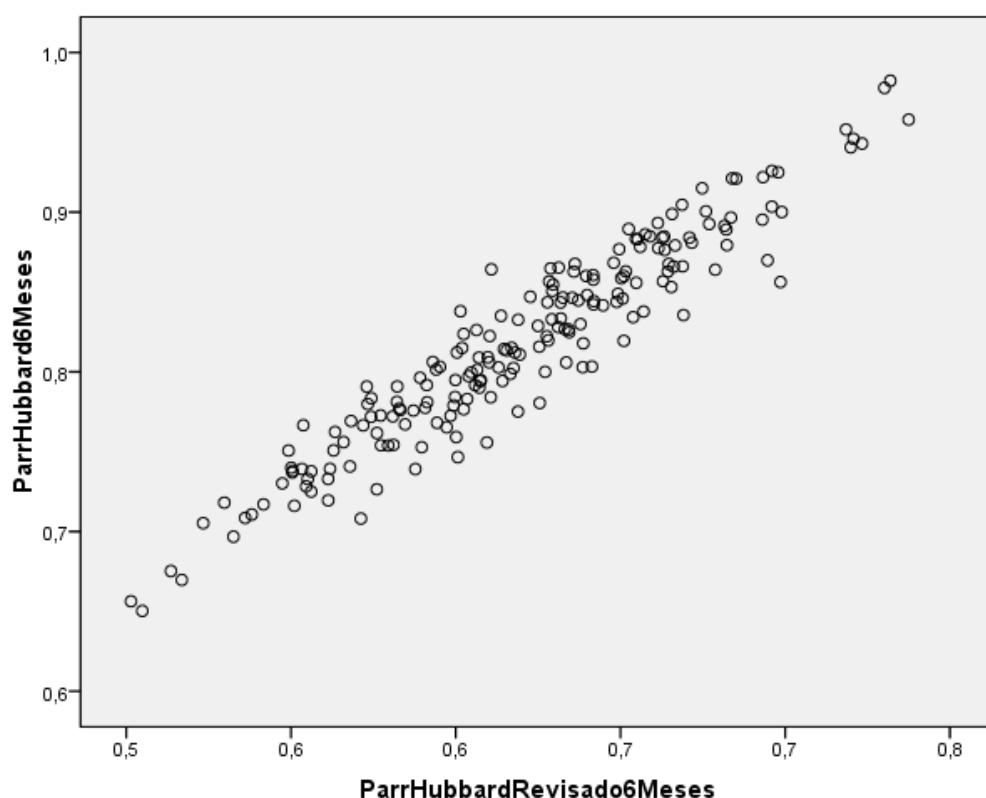
A los 6 meses, se observó una muy buena relación lineal entre Cociente Media Calibres y Hubbard-Parr Revisado, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson significativo igual a 0,927. (Fig. 61, Tabla 29).



**Figura 61:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas en el instante final mediante el método de Cociente de medias y el método de Hubbard-Parr revisado.

### 2.b.3. Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado a los 6 meses:

Se observó una muy buena relación lineal entre Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de Pearson significativo igual a 0,952. (Fig. 62, Tabla 29).



**Figura 62:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas en el instante Final mediante el método de Hubbard-Parr y el método de Hubbard-Parr Revisado.

Por tanto, a los 6 meses, se observó una muy buena correlación entre las diferentes fórmulas, y se obtuvo una correlación ligeramente superior entre el índice Hubbard-Parr y el índice Hubbard-Parr Revisado.

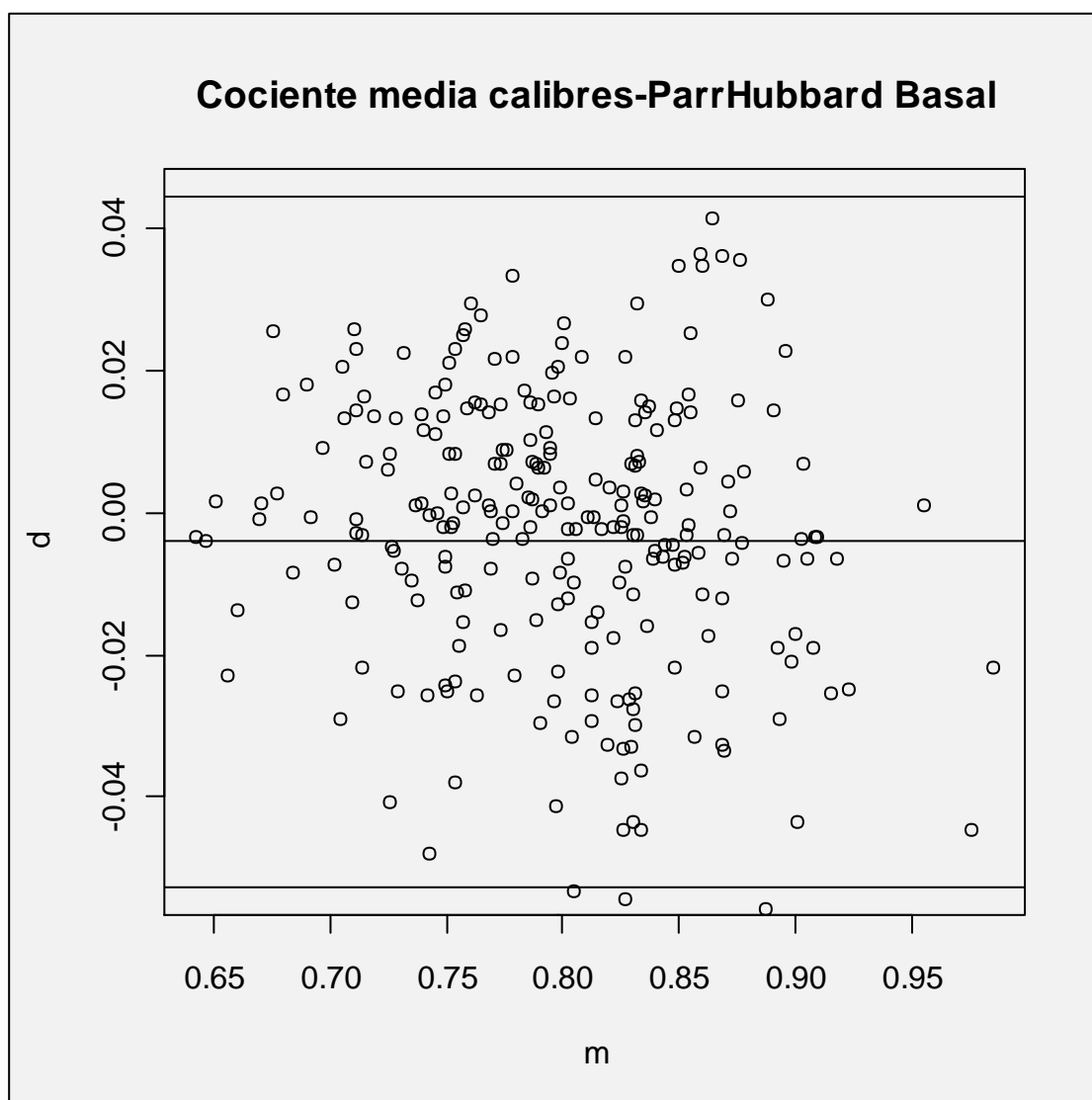
	Cociente media Calibres 6 meses	Hubbard-Parr 6 meses	Hubbard-Parr Revisado 6 meses
Cociente media Calibres 6 meses	1	0,95	0,927
Hubbard-Parr 6 meses	0,950	1	0,952
Hubbard-Parr Revisado 6 meses	0,927	0,952	1

La correlación es significativa al nivel del 0,01 (bilateral)

**Tabla 29:** Correlación de Pearson entre los diferentes métodos de análisis de las mediciones estudiados en el instante final.

### 3. Grado de acuerdo entre las diferentes fórmulas:

#### 3.a. Comparación entre cociente media calibre y Hubbard-Parr en el instante basal:



**Figura 63:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el método de medición Cociente de Medias y Hubbard-Parr en el instante basal. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos esté entre -0,0526 y 0,0445. El índice Cociente media calibres proporcionó valores 0,0526

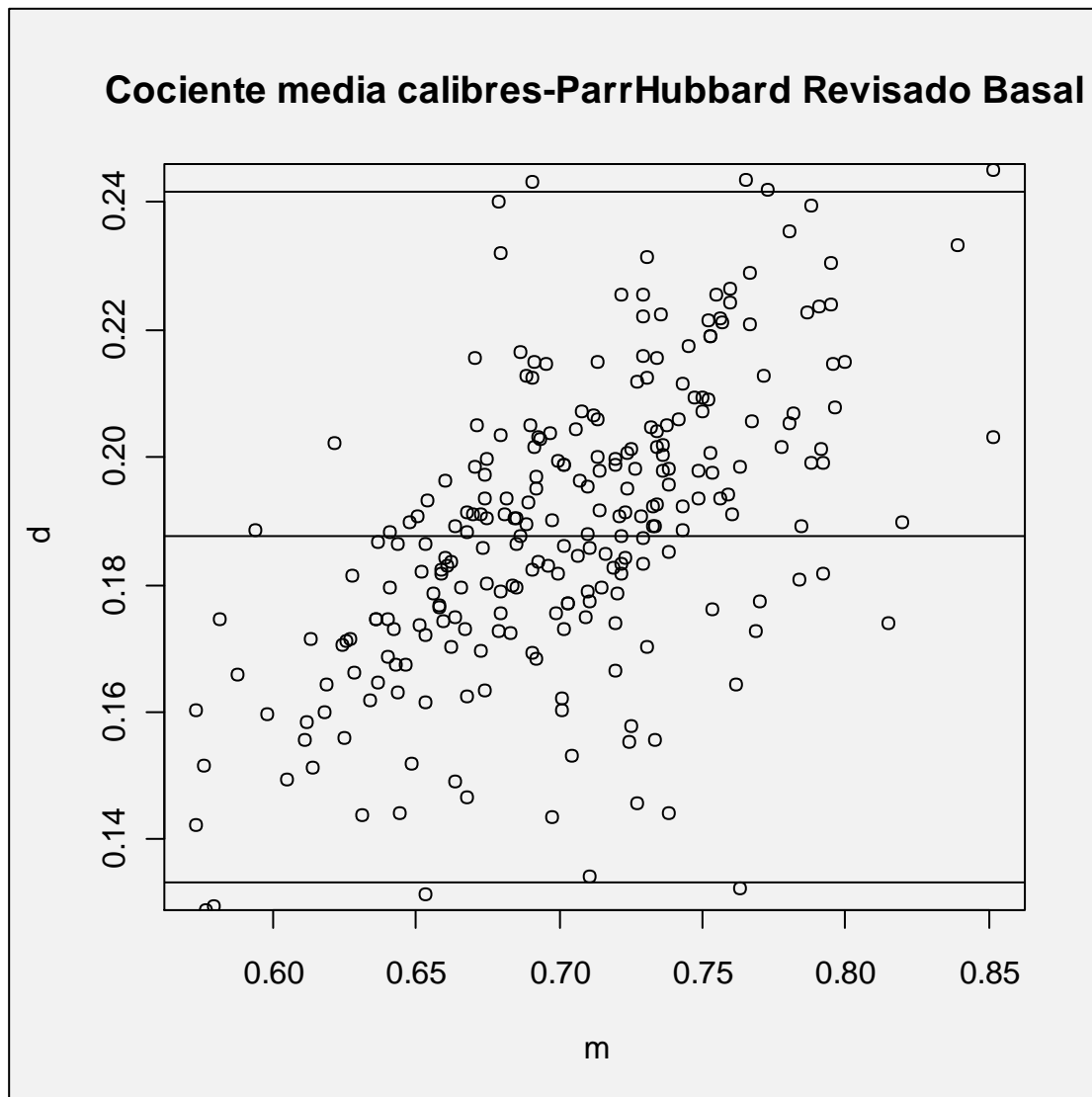


unidades por debajo del índice Hubbard-Parr y 0,0445 unidades por encima en el instante basal.

Si se calculan índices numéricos que miden la consistencia/acuerdo/fiabilidad entre los dos métodos, como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff , la media de las correlaciones bivariantes entre los métodos, se obtuvo un valor de 0,92, con IC(95%): 0,90-0,94. Por tanto, puede decirse que se observó una elevada consistencia/fiabilidad entre las mediciones de ambos métodos.



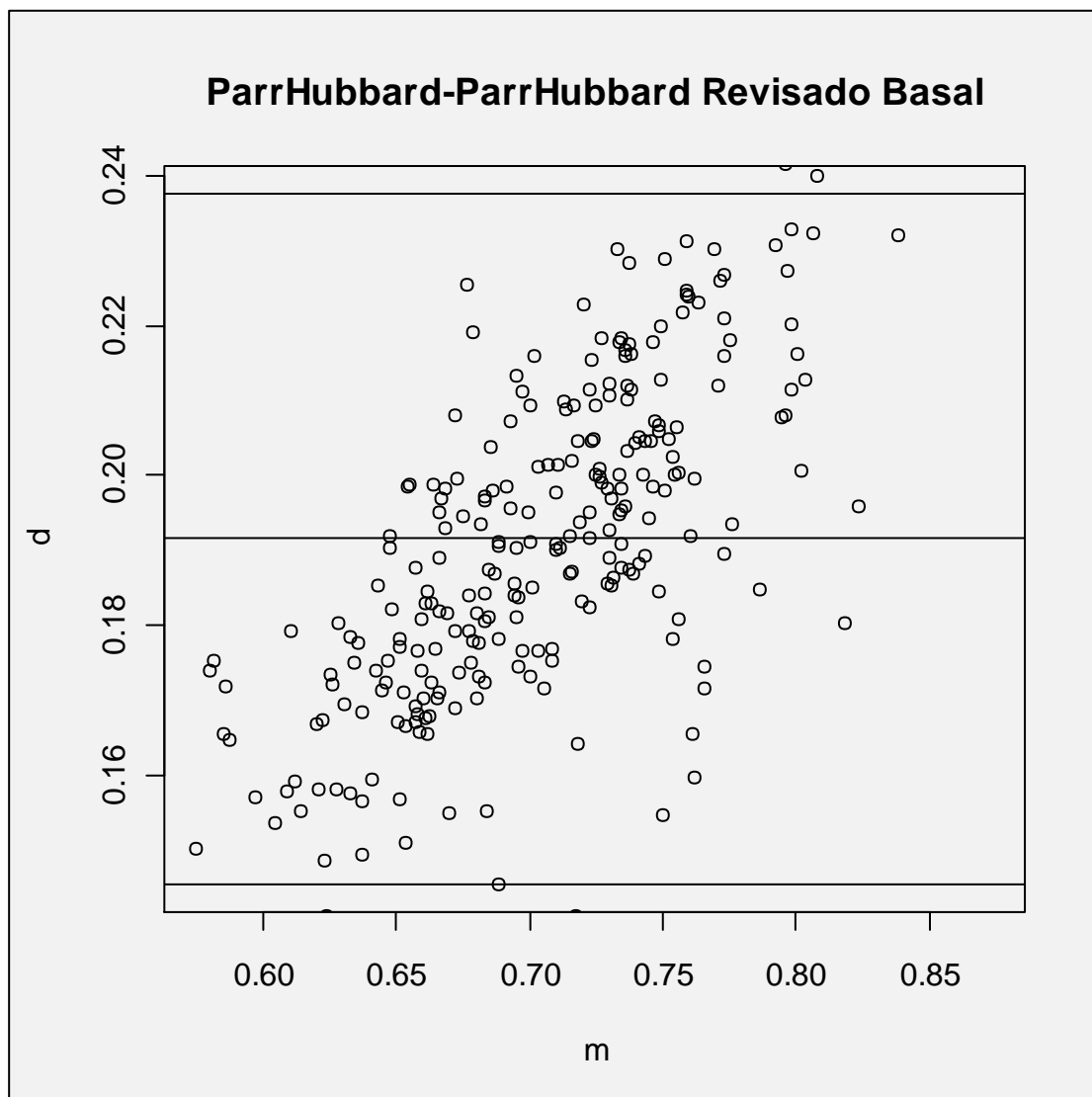
### 3.b. Comparación entre cociente media calibre y Hubbard-Parr Revisado en el instante basal:



**Figura 64:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el método de medición Cociente de medias y el Hubbard-Parr Revisado. Se observa que el rango de valores obtenido es amplio y que existen datos por encima y por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El índice Cociente media calibres proporcionó valores entre 0,1334 unidades y 0,2417 unidades por encima del índice Hubbard-Parr Revisado en el instante basal. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango .

### 3.c. Comparación entre Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado en el instante basal:

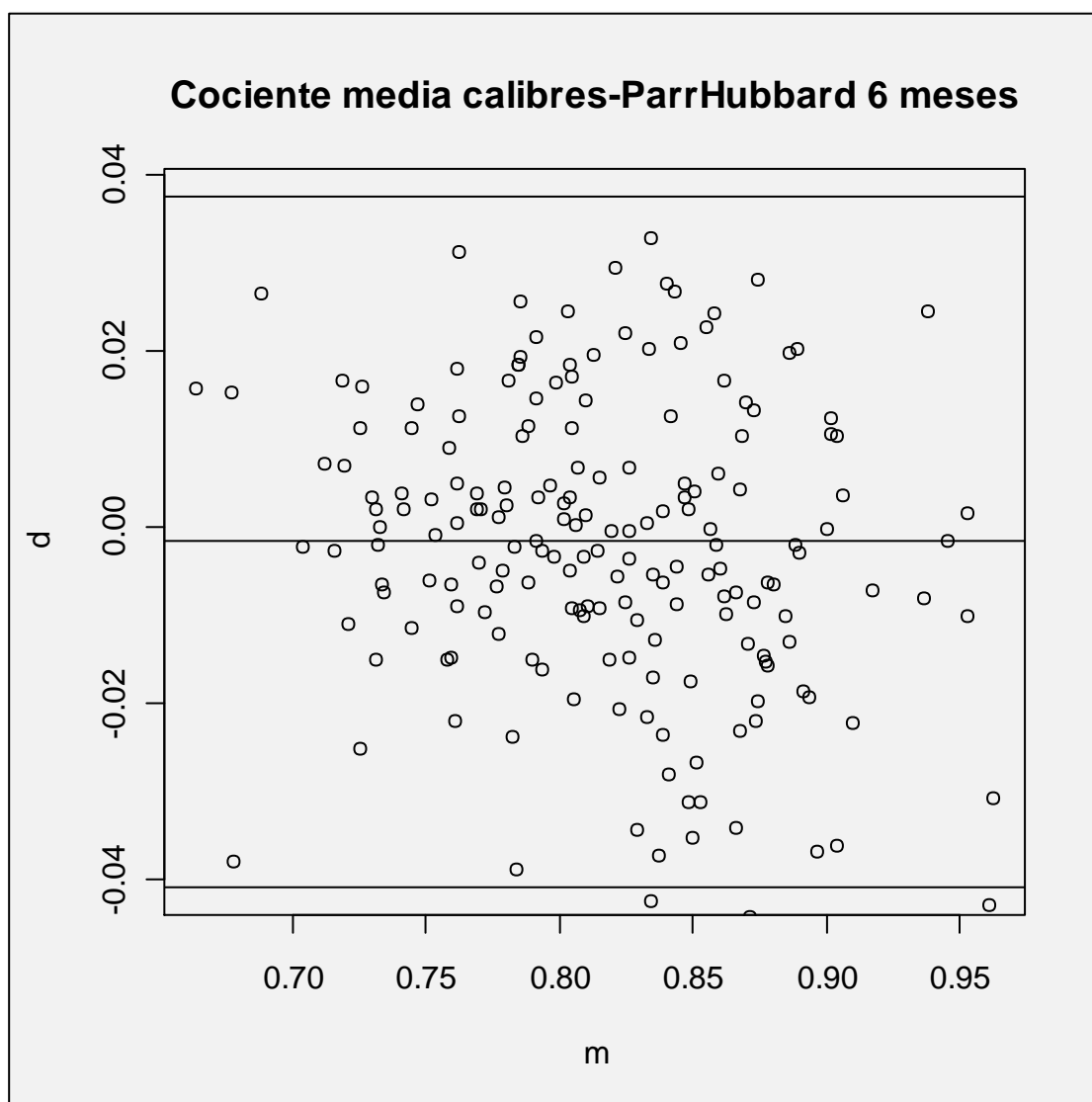


**Figura 65:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el método de medición Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado. Se observa que el rango de valores obtenido es amplio y que existen datos por encima y por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El índice Hubbard-Parr proporcionó valores entre 0,1455 unidades y 0,2376 unidades por encima del índice Hubbard-Parr Revisado en el instante basal. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango .

En el caso de las comparaciones con el método de Hubbard-Parr Revisado el grado de consistencia/acuerdo es bajo lo cual tiene sentido ya que existen diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones obtenidas con este método y las obtenidas con los otros dos métodos.

### 3.d. Comparación entre cociente media calibre y Hubbard-Parr a los 6 meses:



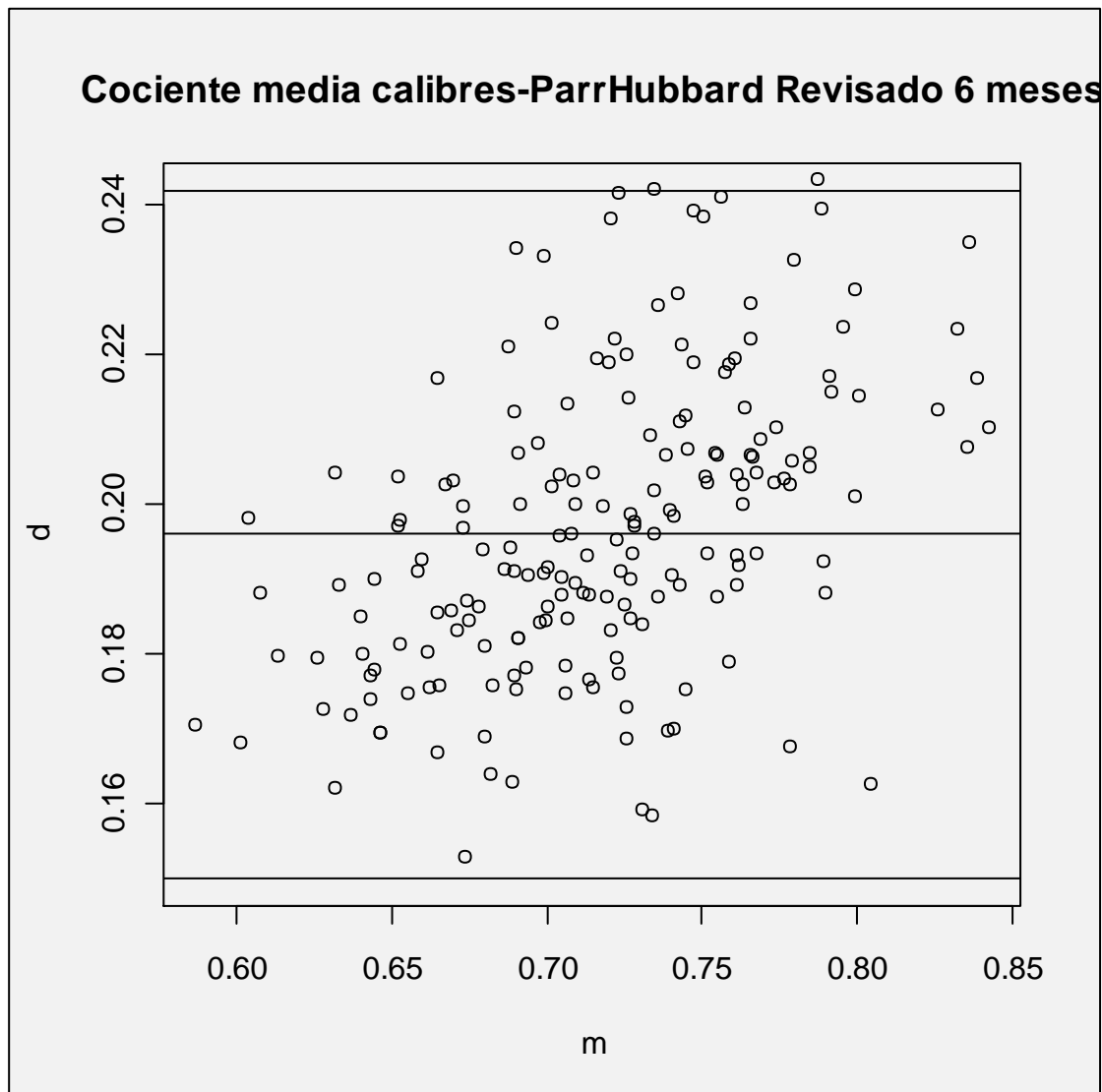
**Figura 66:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el método de medición Cociente de Medias y Hubbard-Parr en el instante final. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El índice Cociente media calibres proporcionó valores 0,0409 unidades por debajo del índice Hubbard-Parr y 0,0374 unidades por encima a los 6 meses.

Si se calculan índices numéricos que miden la consistencia/acuerdo/validez entre los dos métodos, como el coeficiente de correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff, la media de las correlaciones bivariantes entre los métodos, se obtuvo un valor de 0,95, con IC(95%): 0,93-0,96. Por tanto, puede decirse que se observó una elevada consistencia/fiabilidad entre las mediciones a los 6 meses de ambos métodos.



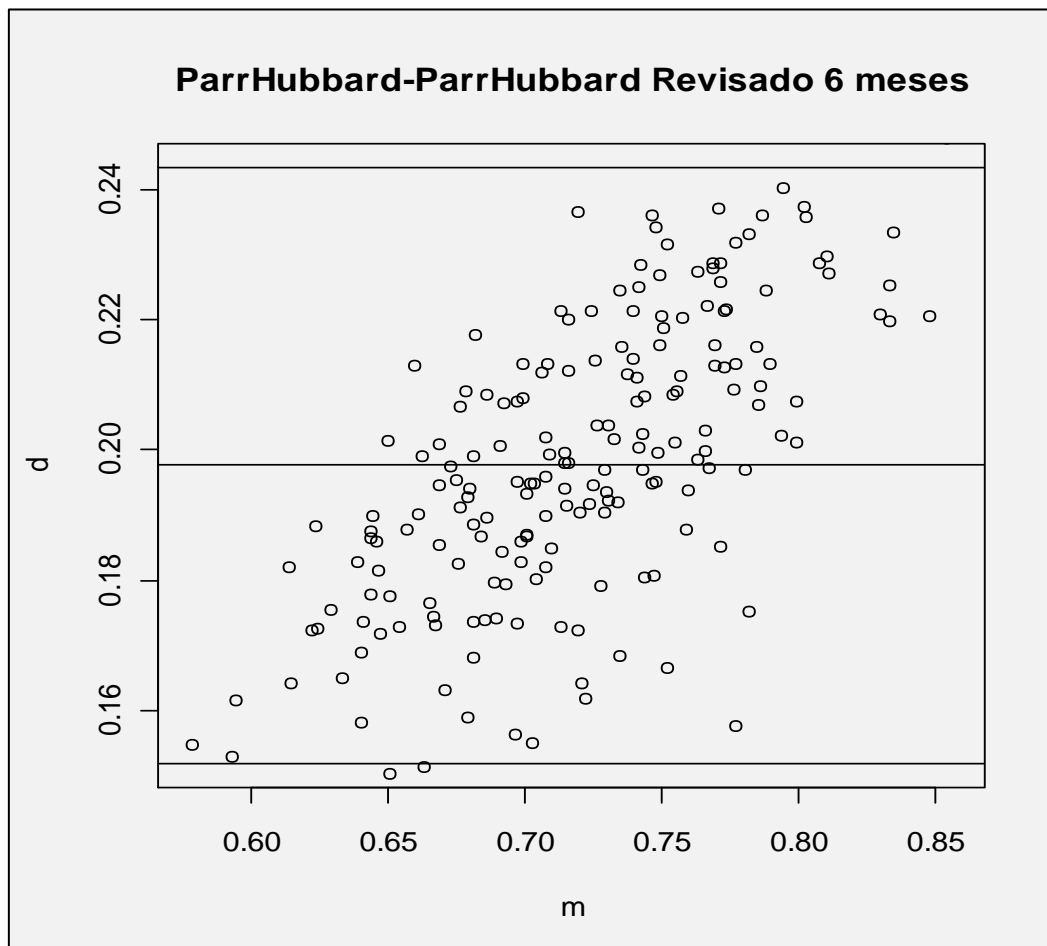
### 3.e. Comparación entre cociente media calibre y Hubbard-Parr Revisado a los 6 meses:



**Figura 67:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el Cociente de Medias y Hubbard-Parr Revisado. Se observa que el rango de valores obtenido es amplio y que existen datos por encima y por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El índice Cociente media calibres proporcionó valores entre 0,1501 y 0,2417 unidades por encima del índice Hubbard-Parr Revisado a los 6 meses. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango .

### 3.f. Comparación entre Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado a los 6 meses:



**Figura 68:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el método de medición Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado. Se observa que el rango de valores obtenido es amplio y que existen datos por encima y por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

El índice Hubbard-Parr proporcionó valores entre 0,152 y 0,2433 unidades por encima del índice Hubbard-Parr Revisado a los 6 meses. Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos estén en ese rango .

En el caso de las comparaciones con el método de Hubbard-Parr Revisado el grado de consistencia/acuerdo es bajo lo cual tiene sentido ya que existen diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones obtenidas con este método y las obtenidas con los otros dos métodos.

## **EXPERIMENTO 4: MÉTODO AUTOMÁTICO.**

### **1. Cálculo de las medidas de validez del método automático:**

Se realiza un experimento para realizar el cálculo de las medidas de validez del método automático

Considerando el método automático como una prueba diagnóstica para la clasificación de las venas y las arterias del ojo, se pueden calcular las medidas de validez de dicha prueba, como por ejemplo, la probabilidad de clasificar correctamente las venas y la probabilidad de clasificar correctamente las arterias.

Se escogen 100 retinografías al azar y se realiza el análisis de IAV de modo automático, después se estudian los puntos de medición escogidos de modo automático por el programa y se comprueba si la clasificación es correcta o incorrecta (Tablas 30 y 31).

#### **Visita basal**

	<b>Clasificación como arterias por el programa automático</b>	<b>Clasificación como venas por el programa automático</b>	<b>Total</b>
<b>Arterias reales</b>	1151	112	<b>1263</b>
<b>Venas reales</b>	52	580	<b>632</b>
<b>Total</b>	<b>1203</b>	<b>692</b>	<b>1895</b>

**Tabla 30:** Comparación entre el experto y el sistema informático para la clasificación de los segmentos vasculares en arteria y vena en la visita basal.

1. Probabilidad de clasificar correctamente una arteria =  $1151/1263=0,911$

2. Probabilidad de clasificar correctamente una vena =  $580/632=0,918$

Es decir, el método automático posee unas elevadas probabilidades de clasificación correcta de los vasos, el 91% de las arterias y el 92% de las venas son



clasificadas correctamente. Y son muy similares ambas probabilidades de detección correcta.

3. Probabilidad de clasificar incorrectamente una arteria =  $1 - 0,911 = 0,089$ . Es decir, el 9% de las arterias son clasificadas incorrectamente como venas.

4. Probabilidad de clasificar incorrectamente una vena =  $1 - 0,918 = 0,082$ . El 8% de las venas son clasificadas incorrectamente como arterias.

5. Probabilidad de que si el método automático detectó una arteria, sea en realidad una arteria =  $1151 / (1151 + 52) = 0,957$

6. Probabilidad de que si el método automático detectó una vena, sea en realidad una vena =  $580 / (112 + 580) = 0,838$

Por tanto el 96% de los vasos clasificados como arterias, son efectivamente arterias y el 84% de los vasos detectados como venas, son efectivamente venas.

### Visita final

	Clasificación como arterias por el programa automático	Clasificación como venas por el programa automático	Total
Arterias reales	889	58	947
Venas reales	43	461	504
Total	932	519	1451

**Tabla 31:** Comparación entre el experto y el sistema informático para la clasificación de los segmentos vasculares en arteria y vena en la visita final.

1. Probabilidad de clasificar correctamente una arteria =  $889 / 947 = 0,939$

2. Probabilidad de clasificar correctamente una vena =  $461 / 504 = 0,915$

Es decir, el método automático posee unas elevadas probabilidades de clasificación correcta de los vasos, el 94% de las arterias y el 92% de las venas son

clasificadas correctamente. Es por tanto ligeramente superior la probabilidad de detectar una arteria que la de detectar una vena.

En la visita final aumentó ligeramente la probabilidad de detectar correctamente una arteria y en consecuencia disminuyó ligeramente la probabilidad de detectar correctamente una vena.

3. Probabilidad de clasificar incorrectamente una arteria =  $1 - 0,939 = 0,061$ . Es decir, el 6% de las arterias son clasificadas incorrectamente como venas.

4. Probabilidad de clasificar incorrectamente una vena =  $1 - 0,915 = 0,085$ . El 9% de las venas son clasificadas incorrectamente como arterias.

5. Probabilidad de que si el método automático detectó una arteria, sea en realidad una arteria =  $889 / (889 + 43) = 889 / 932 = 0,954$

6. Probabilidad de que si el método automático detectó una vena, sea en realidad una vena =  $461 / (58 + 461) = 461 / 519 = 0,888$

Por tanto el 95% de los vasos clasificados como arterias, son efectivamente arterias y el 89% de los vasos detectados como venas, son efectivamente venas.

## 2. Estudio comparativo entre el método manual y automático:

Se escogen 125 fotografías de fondo de ojo al azar en el instante basal y se realiza el análisis estadístico para comparar el método de análisis semiautomático con el método de análisis automático (Tabla 32).

	Media	Desviación Típica
<b>Automático</b>	0,835545	0,0902387
<b>Manual</b>	0,830621	0,0802066

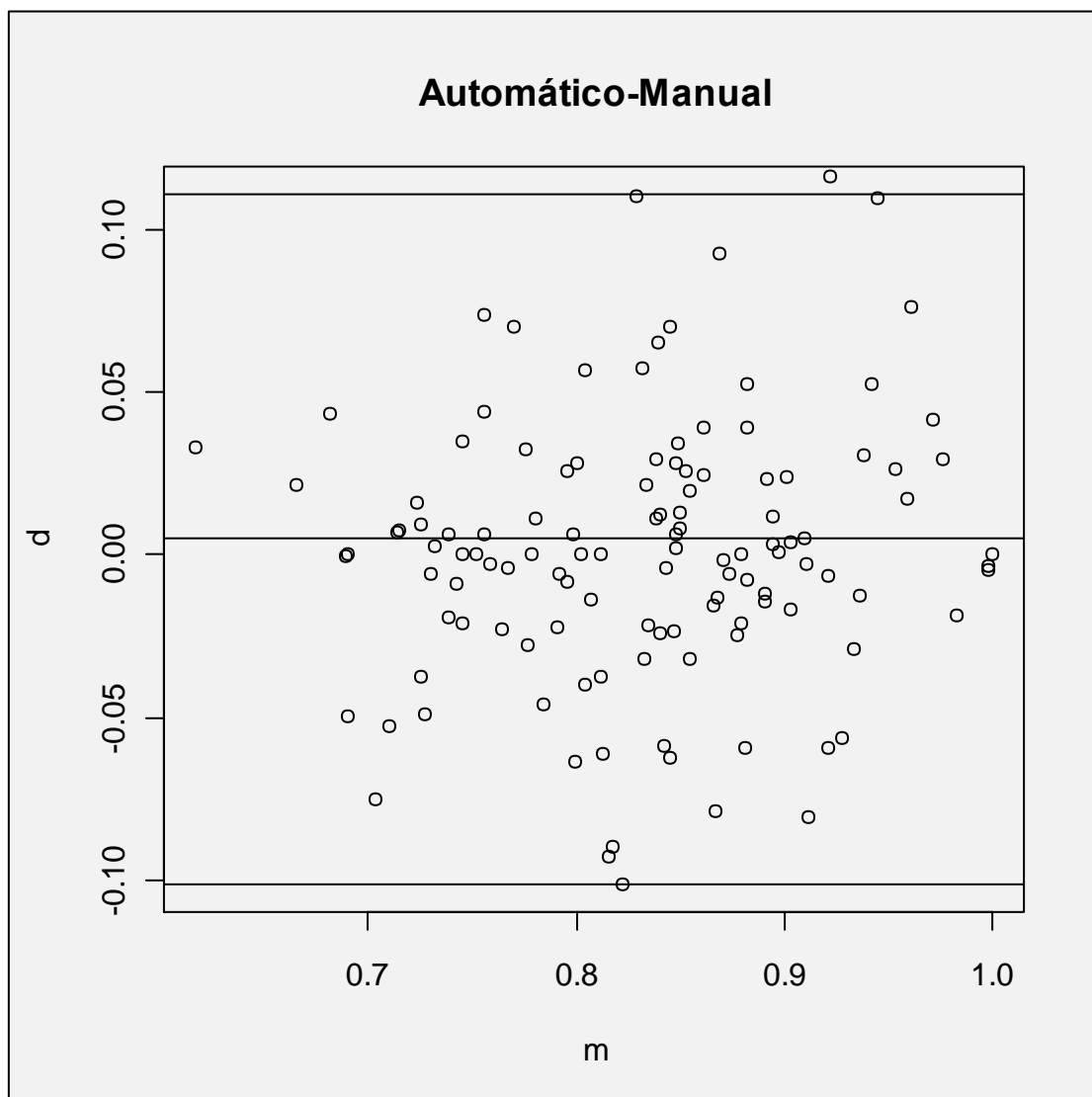
**Tabla 32:** Se muestra la estadística descriptiva con el análisis de la media y desviación típica de las mediciones mediante el método manual y automático.

Se puede aceptar la normalidad de las variables, por tanto se aplicó un análisis ANOVA de 1 factor.

### 2.a. Estudio de las diferencias entre las mediciones realizadas mediante el método automático y manual:

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos (manual y automático) ( $p=0,649$ ).

## 2.b. Estudio del grado de acuerdo entre el método manual y automático:



**Figura 69:** Representación mediante Gráficos de Bland Altman donde se muestra el cociente entre el valor promedio obtenido entre el índice manual y el automático. Se observa buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

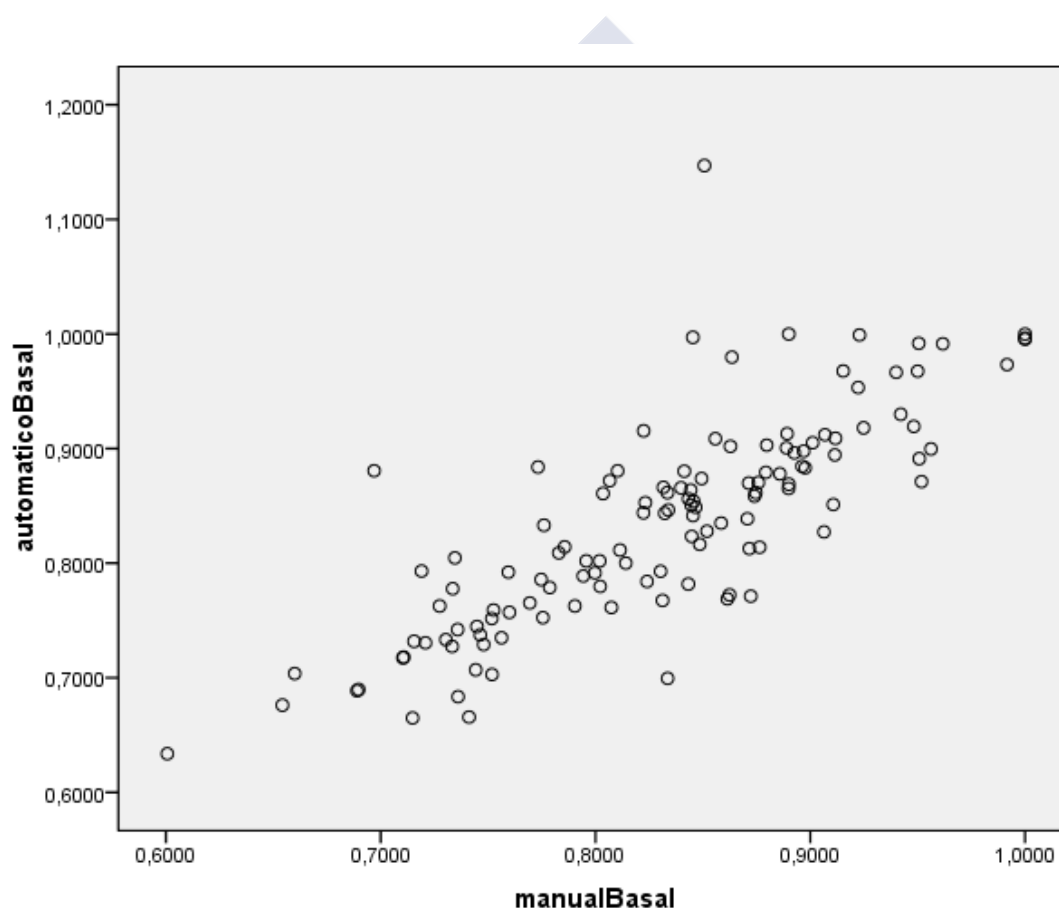
Se espera que el 95% de las diferencias entre ambos métodos esté entre -0,1012 y 0,1110. El método automático puede proporcionar mediciones 0,1012 unidades por debajo del método manual y 0,1110 unidades por encima.

Si se calculan índices numéricos que miden la consistencia/acuerdo/fiabilidad entre los dos métodos, como el coeficiente de

correlación intraclase (ICC), el coeficiente alpha propuesto por Krippendorff , la media de las correlaciones bivariantes entre los métodos, se obtuvo un valor de 0,80. Por tanto, puede decirse que se observó una aceptable consistencia/fiabilidad entre las mediciones de ambos métodos.

## 2.c. Correlación entre ambos métodos manual y automático:

Se observó una buena relación lineal entre ambos métodos, la correlación lineal de Pearson tiene un valor significativo igual a 0,805 (Fig. 70, Tabla 33).



**Figura 70:** Diagrama de puntos correspondientes al IAV realizadas sobre la misma fotografías y medidas en el instante Basal mediante el método manual y el método automático.

	Automático	Basal
Automático	1	0,805
Manual	0,805	1

La correlación es significativa al nivel de 0,01 (bilateral)

**Tabla 33:** Se muestra la correlación lineal de Pearson entre el método manual y el método automatizado.





## Discusión

---





Los cambios en el IAV han sido estudiados clásicamente a través de la evaluación oftalmoscópica del fondo de ojo, en la que se compara el calibre arterial con el calibre venoso. Sin embargo, los resultados de estos estudios sólo tienen un valor aproximativo, ya que son subjetivos y poco reproducibles cuando los realizan diferentes exploradores o incluso cuando los realiza un mismo explorador en diferentes momentos (10).

Las enfermedades que afectan al calibre vascular retiniano son múltiples y cada vez se conocen más, incluso se postula el posible valor pronóstico del IAV en algunas de ellas como la Hipertensión Arterial (HTA) (1-5) o la Diabetes Mellitus (DM) (13-17) entre otras. Nace, por tanto, la necesidad de encontrar un método de cálculo del IAV que sea objetivo y reproducible. Como consecuencia, surgen diferentes técnicas de medición del mismo, que según su fase de desarrollo se dividen en dos pasos y ambos pasos pueden afectar a la anchura aparente de los vasos sanguíneos: el primero es la adquisición de imágenes y el segundo es la medición de la anchura de los vasos.

Las técnicas de adquisición de imagen incluyen normalmente retinografías en color de fondo de ojo tomadas por cámaras convencionales (30, 58, 82, 83) o cámaras no midriáticas (6, 11, 59); también se realizan retinografías monocromáticas (50, 84, 85) y más raramente se emplean vídeos (82) o el Scaninng Laser Ophthalmoscope (86). Algunos observadores incluso han empleado la angiografía fluoresceínica para obtener un mayor contraste de los vasos (52).

Las fotografías obtenidas en la mayor parte de los trabajos publicados son en color (6, 11, 62, 87-89) aunque también existen trabajos en los que se trabaja con retinografías en blanco y negro (13, 84)

Un aspecto importante a destacar es, por un lado, la existencia de múltiples modelos y marcas de retinógrafos para la adquisición de imágenes en los diferentes centros hospitalarios y la constante renovación de los mismos por nuevos modelos más modernos y, por otro lado, el incremento de realización de retinografías por cámaras no midriáticas, sobre todo debido a la introducción de la

telemedicina en nuestros centros de atención primaria. Todo ello podría influir negativamente a la hora de realizar una comparación entre los distintos IAV medidos en imágenes tomadas con las diferentes marcas y tipos de retinógrafos.

El segundo paso para el cálculo del IAV es la técnica empleada para la medición del grosor vascular. Entre las técnicas de medición clásicas se incluyen las técnicas micrométricas en las que un observador estima la anchura del vaso por medio de la observación de la imagen de fondo de ojo proyectada en una diapositiva o en un negativo de la misma; ésta es una determinación subjetiva, tanto de la detección del borde del vaso como del punto de medición y poco reproducible en medidas sucesivas. Las técnicas visuales o micrométricas más habituales incluyen el uso de microscopios de medida (90), microscopios de tornillo micrométrico (30) o proyecciones de imágenes con medición por calibradores (18, 82, 91). Otro tipo de técnica es la densitométrica que incluye la densitometría de barrido (46, 90, 91) y el análisis de imágenes (55, 92) y también se realizan combinaciones de ambos métodos mediante el llamado análisis microdensitométrico.

Las técnicas de medición clásicas, ya sean micrométricas o densitométricas, son manuales, es decir, se estima el calibre de los vasos en base a un observador que busca y mide los bordes de los mismos. Por tanto, todas estas mediciones son subjetivas ya que los bordes de los vasos son muy difíciles de definir, y en consecuencia la fiabilidad de estas técnicas de medida son bajas.

El desarrollo de la microdensitometría computarizada (53) logra el cálculo de la anchura del vaso de modo automático y ya no es necesaria ninguna decisión subjetiva con respecto a la elección del borde del vaso, aunque lo que sí se debe escoger es el segmento del vaso que se va a medir. Posteriormente se desarrolló un método computarizado en el que se automatiza no sólo la elección del borde del vaso, sino también la elección de los segmentos vasculares susceptibles de medición (21, 22). Con la automatización de ambos pasos se logra un método objetivo que permite un examen cuantitativo del calibre vascular sobre fotografías de fondo de ojo, llegando a ser reproducible incluso entre distintos observadores.

Llegar a este punto supuso un gran avance y permitió la inclusión del análisis de fondo de ojo para medir el IAV en importantes estudios sobre la HTA (6, 87-89, 93) o DM (13-16, 94) entre otras enfermedades. A pesar de esto, el método todavía contaba con dos pasos que seguían siendo manuales, la localización del nervio óptico, paso previo para la correcta medición del IAV, y la clasificación de los vasos como arteria o vena; este hecho suponía un aumento considerable del tiempo empleado para la medición de cada imagen y hacía imposible que la medición del IAV se convirtiese en un parámetro más en la evaluación de enfermedades de forma rutinaria.

Para lograr la normalización del uso del IAV en la práctica clínica se necesitan por tanto varios puntos fundamentales: la universalización del método independientemente del retinógrafo usado, el empleo de un método de cálculo del IAV validado y la automatización completa del método de medición del IAV. Estos pasos son precisamente los diferentes experimentos que se desarrollan en este trabajo, en los que se pretende lograr la validación de un método de medición del IAV universal y totalmente automático que pueda ser empleado por cualquier médico en aquel paciente que lo precise.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

*1. Experimento 1. Estudio de las diferencias en el IAV dependiendo del observador que efectúa las mediciones y de la retinografía empleada:*

Debido a la necesidad de universalización del método de medida del IAV, se busca que el cálculo sea reproducible con independencia del modo de adquisición de la imagen, es decir, con independencia de que la imagen empleada sea en color o en blanco y negro o que la realización de la misma se haga con un retinógrafo no midriático o midriático.

Lo estudios publicados hasta el momento realizan sus mediciones en fotografías adquiridas con un solo tipo de retinógrafo, incluso en el caso de estudios multicéntricos como en ARIC (6).

Si se quiere lograr la extensión del método a la práctica clínica diaria, de modo que pueda ser empleado en cualquier hospital o centro de salud que lo desee, resultaría imposible que la adquisición de las imágenes se realizase con un tipo determinado de retinógrafo. Por otro lado, parece lógico pensar que dependiendo del tipo del retinógrafo empleado, midriático o no, del color de la retinografía o incluso del tipo de retinógrafo, la incidencia de la luz sobre la retina sea diferente y por tanto pueda influir en la posterior medición del ancho de los vasos. No hay resultados publicados al respecto. Existen dos trabajos en los que se compara la anchura de los vasos en imágenes obtenidas mediante retinografías y mediante angiografías; **en 1988 Eaton** (52) realiza un estudio en el que se analiza el ancho de los vasos en angiografías y determina que la fluoresceína aumenta la anchura del vaso con respecto al empleo de la retinografía debido a la unión de la fluoresceína con las proteínas de la columna sanguínea. **Hodge, Parr y Spears en 1969** (46) encontraron que los vasos tienen menor grosor en las imágenes obtenidas con angiografías fluoresceínicas que con las imágenes estándar. En **2011 Pakter et al** (95) publican un trabajo en el que se comparan los grosores de vasos retinianos de retinografías con angiografías fluoresceínicas obteniéndose unos

coeficientes de correlación de Pearson de 0,84-0,87 para el grosor de arterias y 0,93-0,94 para el grosor de las vénulas.

En el primer experimento de nuestro trabajo se utilizan retinografías en color y blanco y negro. Se escogen 12 voluntarios sin enfermedades conocidas y se realizan 6 retinografías a cada ojo tomadas por 4 retinógrafos diferentes, se estudia el IAV en todas ellas y se comparan dos a dos; no se encuentran diferencias significativas en los valores del IAV obtenido ( $p=1$ ). Se obtiene en todos los casos un coeficiente de correlación (Pearson e intraclase) superior al 0,87. Los gráficos de Bland-Altman también hablan de buena concordancia, ya que existen muy pocos valores por encima o por debajo de 1,96 desviaciones estándar alrededor de la media.

En conclusión, el método de medición del IAV empleado en este trabajo no presenta diferencias para el cálculo de IAV atribuibles al tipo de retinógrafo empleado o al color de la retinografía.

*2. Experimento 2. Validación de un nuevo método de medición del IAV basado en snakes, comparándolo con el método lineal ya validado anteriormente. Estudio de la variabilidad debida a distintos observadores (variabilidad interobservador). Comparación del IAV antes y después de un tratamiento antihipertensivo:*

Es de sobra conocida la relación existente entre HTA y estrechamiento del IAV a expensas de un estrechamiento del árbol vascular arterial. En la literatura científica existen muchos trabajos que tratan de estudiar el IAV y relacionar sus cambios con la HTA, la enfermedad cerebrovascular o la enfermedad coronaria (6-8), pero la principal dificultad es que la valoración mediante oftalmoscopia, como ya se ha comentado, se asocia a grandes variaciones intra e interobservador (10). Se ha intentado valorar cuantitativamente el IAV en diferentes publicaciones, siendo la más conocida la del estudio ARIC (6, 88, 89) en el que se tratan de relacionar los cambios en el IAV de pacientes hipertensos con la enfermedad coronaria o cerebrovascular.

**Pose, Gómez- Ulla et al** (21, 23) desarrollaron y publicaron un método semiautomático informatizado en el que a partir de retinografías de fondo de ojo se podía obtener el IAV de las mismas con una buena reproducibilidad intra e interobservador; se empleó para el estudio del IAV y sus variaciones con la edad y también se empleó para el estudio de los cambios en el IAV producidos en pacientes hipertensos (22, 23). Se observó que el IAV disminuía con la edad, que era menor en pacientes hipertensos que en individuos normales y que en estos pacientes tras tratamiento antihipertensivo el índice aumentaba, proyectándose como un posible factor pronóstico (22, 23).

Tomando como base este sistema denominado ART VENA, basado en un método lineal para la detección de ancho de vasos, se desarrolla para este segundo experimento un método denominado *Snake* que está basado en crestas deformables. Se realizó una comparativa entre ambos métodos en la que se analizaron 1652 segmentos vasculares de 21 imágenes y se vio que el método *Snake* era capaz de detectar un 5% más de vasos (el 84,6% frente al 89,5%) y, lo que es más importante, lograba una reducción de un 8% a un 1% de detección de

falsos positivos. Como conclusión se afirma que el método *Snake* posee mayor rendimiento que ART-VENA (24)

Las ventajas del método *Snake* con respecto al método empleado en el programa ART-VENA son claras; se puede detectar, por un lado, la dirección real del vaso y, por otro lado, los bordes del mismo en ese segmento a estudiar. La ventaja fundamental es que se logran medir múltiples puntos en ese segmento y por tanto la medición final es la suma de los anchos de todas estas cuantificaciones, de modo que se obtiene una cuantificación del grosor del vaso más fiel a la realidad.

En este segundo experimento se estudian ambos métodos, el lineal y el *Snake*, obteniéndose una correlación lineal de Pearson entre ellos superior al 0,9 así como una concordancia superior también al 0,9 (estudiada mediante el coeficiente de correlación intraclass), por lo que se puede objetivar la equivalencia entre ambos métodos y por tanto la validación del nuevo método *Snake*. También se emplea este nuevo método para el estudio de pacientes hipertensos antes y después del tratamiento antihipertensivo con un ARA-2, obteniéndose diferencias significativas, de modo que después del tratamiento el IAV aumenta. Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por Pose- Reino et al (22) ya que en ambos se observa un aumento significativo del IAV tras el tratamiento.

En estos dos primeros experimentos se observa una importante limitación que es la existencia de una gran variabilidad interobservador, tanto en el método lineal como en el método *Snake*. Una posible causa de dicha variabilidad podría ser el escaso número de segmentos vasculares escogidos por parte de los observadores en cada retinografía. El sistema informático nos proporciona una media de 45-50 segmentos vasculares que se pueden seleccionar en cada fotografía para la clasificación de vasos en arteria o vena. Sin embargo, los observadores solo seleccionaron 10 segmentos arteriales y 10 segmentos venosos como máximo por retinografía, lo cual pudo resultar insuficiente para eliminar el sesgo que supone la diferente selección de vasos por parte de cada observador. En

los estudios en los que se trabajó con el sistema ART-VENA se escogieron como mínimo 24 segmentos de arterias y 24 segmentos de venas por retinografía y así consiguieron lograr una buena reproducibilidad intra e interobservador (21-23).

*3. Experimento 3. Comparación entre el método de medición basado en el cociente de medias con el método clásico de medición Hubbard-Parr y el método Hubbard-Parr Revisado (Método Knudtson):*

Se han desarrollado diferentes fórmulas para la determinación del IAV a partir de la obtención del ancho de los vasos y el más empleado a pesar de su complejidad es el método de Hubbard-Parr, que se basa en la determinación del Equivalente de la Arteria Central de la Retina (CRAE) y del Equivalente de la Vena central de la Retina (CRVE) (48,49,73) otros métodos son el cociente entre la media del ancho de las arterias y la media del ancho de las venas, el cociente entre la suma del diámetro de las arterias y la suma del diámetro de las venas o el cociente entre el cuadrado de la suma del ancho de las arterias y el cuadrado de la suma del diámetro de las venas.

Los estudios más importantes acerca del cálculo del IAV emplean el método de Hubbard-Parr, entre ellos el estudio ARIC o el Beaver Dam Study (6, 58). En 2007 se publica un trabajo en el que surge un nuevo método desarrollado por **Knudtson** a partir del método de Hubbard-Parr (60); en él se introducen nuevas fórmulas que poseen buena correlación con el método clásico basado en la medición del CRAE y del CRVE, y además ofrecen importantes ventajas como son la independencia de los resultados con respecto al número de vasos empleados, la independencia de la escala empleada y su mayor facilidad de implementación.

A pesar de la existencia de diferentes fórmulas para realizar el cálculo del IAV, no es hasta 2007 cuando **Hemminki** (61) publica un estudio con el objetivo de comparar el método Hubbard-Parr con otros métodos de determinación del IAV como son la fórmula de la suma de los diámetros arteriales entre la suma de los diámetros venosos, la fórmula del cuadrado de la suma de los diámetros arteriales entre el cuadrado de la suma de los diámetros venosos y la fórmula del



cociente entre la media de los diámetros arteriales y la media de los diámetros venosos. Los mejores resultados de correlación se obtienen comparando el CRAE/CRVE con la suma del cuadrado del ancho de las arterias entre la suma del cuadrado del ancho de las vénulas ( $R^2$  0,92). Los IAV calculados usando la media de anchos de arterias y venas o la suma de anchos de arterias y venas obtienen con respecto al método de Hubbard-Parr unas asociaciones claramente más bajas ( $R^2$  0,38-0,40 y  $R^2$  0,41-0,48 respectivamente).

En el presente experimento se emplea la fórmula de media de anchos de arterias entre media de anchos de venas para la determinación del IAV, de modo que se hace necesaria la validación de este método mediante su comparación con el método basado en CRAE y CRVE; también se realiza una comparativa entre el método empleado en este trabajo y el método Knudtson o Hubbard-Parr Revisado.

Se observa una buena correlación entre el método basado en el cociente de medias y el método de Hubbard-Parr clásico así como entre este método y el método de Hubbard-Parr Revisado, obteniéndose en todos los casos unas correlaciones de Pearson superiores al 0,9. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con nuestro método y el método de Hubbard-Parr ( $p=0,118$ ) pero sí se observan diferencias entre nuestro método y el método Hubbard-Parr Revisado ( $p=0<0,001$ ) así como entre el método de Hubbard-Parr y Hubbard-Parr Revisado ( $p=0<0,001$ ), ya que éste último obtiene valores significativamente menores que con las otras dos fórmulas. Los resultados de este experimento están de acuerdo con la publicación en la que **Knudtson** et al en 2003 (60) comparan la medición del IAV en 44 pacientes empleando la fórmula de Hubbard-Parr y la Revisada y obtienen un coeficiente de correlación de Pearson superior al 0,9. Sin embargo, las diferencias entre los valores fueron estadísticamente significativas, ya que la media del IAV con el método clásico fue de 0,85 y con la revisada de 0,69.

*4. Experimento 4. Comparación entre el método semiautomático basado en snakes con un método de medición del IAV totalmente automático:*

El perfeccionamiento del método de medición del IAV a partir de retinografías de fondo de ojo culmina con la automatización completa de los diferentes pasos, desde la detección de los bordes de la papila hasta la clasificación de los segmentos de los vasos en arteria o vena. En este experimento se ha logrado alcanzar este objetivo, ya que se ha desarrollado un sistema de medición totalmente automático y que es equivalente al método semiautomático basado en *snakes* previamente validado.

Se realiza un experimento previo en el que se comparan en 100 retinografías las detecciones y clasificaciones realizadas por el método automático y las realizadas por un observador experimentado en la clasificación de vasos retinianos; se obtiene un porcentaje de clasificación correcta de una arteria del 91,1% y 93,9% (previo y posterior al tratamiento, respectivamente), y de clasificación correcta de una vena del 91,8% y 91,5% (previo y posterior al tratamiento, respectivamente). Después de la obtención de estos buenos resultados, se decide comparar el método semiautomático con el método totalmente automatizado en retinografías de 125 pacientes y no se observan diferencias entre los IAV obtenidos con ambos métodos ( $p=0,649$ ), evidenciándose una correlación lineal de Pearson de 0,8 y unos buenos niveles de consistencia medidos a través del coeficiente de correlación intraclass de un 0,8.

En la bibliografía destacan diversos autores que tratan de desarrollar un método perfeccionado que logre la automatización total en el cálculo del índice:

En **2007 Ruggeri et al** (64) desarrollan un método para el cálculo de IAV automático. El nervio óptico precisa ser detectado manualmente y la diferenciación en arteria o vena se realiza a partir de las diferentes características de color de cada tipo de vaso. Este método fue empleado en 14 retinografías y se comparó con la medición del IAV manual empleando la fórmula de Hubbard-Parr clásica y la revisada. El índice de correlación de Pearson entre el método

automático y el manual fue mayor cuando se empleó la fórmula de Hubbard-Parr clásica (0,83) que cuando se empleó la fórmula revisada (0,73).

Un año después, **en 2008, Ruggeri** (65) logra mejorar la versión previa. Para la clasificación en arteria o vena se basa en el reflejo central de los vasos. Este método de clasificación fue evaluado en 20 retinografías donde calculan de modo automático el IAV a partir del CRAE/ CRVE y lo comparan con la estimación manual del mismo índice (el método de Hubbard-Parr clásico) logrando alcanzar una correlación de un 0,88. Una limitación importante es que se necesitan retinografías de alta calidad, difíciles de realizar en muchos pacientes en la práctica clínica diaria.

**Muramatsu et al en 2011** (68) proponen otro método automático para localizar el nervio óptico y medir el IAV. Logran una tasa de errores de 0,11 de media en comparación con los expertos. Aunque esta metodología logra buenos resultados con imágenes de baja resolución, sólo emplea los vasos de mayor tamaño.

**Niemeijer en 2011**(69) propone otra metodología para la medición del IAV de modo automático basándose en el reflejo central y sólo estudia vasos de mayor tamaño. Obtiene una media de error de 0,06 en 40 imágenes.

**Ortega et al en 2010** (66) elaboran un nuevo modelo para la medición del IAV en la que el usuario debe seleccionar el centro del nervio óptico. Después de esto, el programa detecta los vasos y los clasifica en arteria o vena para finalmente realizar el IAV. El método de detección automático combina una clasificación local basada en el color de los vasos y otro clasificador independiente que distingue el tipo de vaso a lo largo del árbol vascular (67). Con este método los autores obtienen una correlación de 0,856 con dos expertos diferentes en un trabajo con 58 imágenes.

Existe gran dificultad a la hora de realizar un método totalmente automático de medición del IAV; el desarrollo de esta metodología es muy complejo debido a la gran heterogeneidad de las imágenes retinianas con respecto al contraste, luz o

nitidez de las mismas, independientemente de la gran variabilidad inherente a las estructuras vasculares retinianas. Por tanto, la metodología automática ideal debería combinar varios procedimientos para lograr la detección reproducible y fiable de los vasos, y precisamente éstos son los objetivos buscados con el método que se propone en este experimento (74-77): una técnica de normalización del contraste de modo que las diferencias en la luminosidad de las fotos no interfieran en el resultado final, un algoritmo de localización automático del nervio óptico, un procedimiento de segmentación y medición de los segmentos vasculares y una técnica de clasificación de los vasos en arterias o venas.

En resumen, los diferentes experimentos que se muestran en este trabajo representan los pasos a seguir para alcanzar un sistema informático de medición del IAV que cumple las siguientes características:

- Independencia del retinógrafo empleado.
- Validación del método *Snake* y mayor rendimiento con respecto al método lineal desarrollado en el programa ART-VENA, ya que se logra una mejor identificación de los segmentos vasculares y una mejor detección de los bordes de los vasos, obteniendo una mayor fiabilidad en la medición de los calibres vasculares.
- Equivalencia con respecto al método de Hubbard-Parr y al método de Hubbard-Parr Revisado.
- Automatización completa del método y equivalencia al método semiautomático

La principal limitación es la falta de reproducibilidad interobservador que se observa en los experimentos 1 y 2, que puede ser debida al escaso número de segmentos vasculares escogidos por los expertos clínicos para la realización de los experimentos; esta limitación, sin embargo, queda subsanada al lograr la automatización completa del método, sin que sea necesaria la toma de las decisiones por parte del experto clínico. Éste pasa a un segundo plano como

simple observador y vigilante de que el sistema funcione adecuadamente, existiendo la opción de modificar los segmentos vasculares escogidos o las clasificaciones realizadas por el sistema, de modo que se puedan corregir hipotéticos errores que puedan surgir.







# Conclusiones

---





- 1- Se ha establecido un método de medición del IAV que es independiente del retinógrafo empleado para la adquisición de la fotografía de fondo de ojo.
- 2- Se ha elaborado un método de medición, *Snake*, que presenta una buena correlación y grado de acuerdo con el sistema de medición validado hasta el momento, el índice lineal.
- 3- Se ha logrado desarrollar un método objetivo y reproducible de medición del IAV en pacientes hipertensos que traduce la afectación de la HTA en la microcirculación retiniana.
- 4- En pacientes con HTA se ha observado una mejoría de la microcirculación retiniana medida a través de un aumento significativo del IAV tras 6 meses de tratamiento antihipertensivo con un bloqueante del receptor de la angiotensina II.
- 5- El método empleado para la medición del IAV es equivalente al método de Hubbard-Parr y al método de Hubbard-Parr Revisado.
- 6- Se ha desarrollado un sistema de medición del IAV totalmente automático equivalente al método manual previamente validado.





# Bibliografía

---



1. Bergbrant A, Hansson L, Jern S. Interrelation of cardiac and vascular structure in young men with borderline hypertension. *Eur Heart J*. 1993;14:1304-14.
2. Friedenwall JS, Wilder HC, Maumenee AE. *Ophthalmic pathology. An atlas and text book*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1952.
3. Leishman R. The eye in general vascular disease: hypertension and arteriosclerosis. *Br J Ophthalmol*. 1957;41:641-701.
4. Vogelius H, Bechgaard P. The ophthalmoscopic appearance of the fundus oculi in elderly persons with arteriosclerosis and normal blood pressures. *Br J Ophthalmol*. 1950;34:404-8.
5. Shelburne SA. The retina in hypertensive disease. *Ann Intern Med*. 1957;47:1154-64.
6. Hubbard LD, Brothers RJ, King WN, Clegg LX, Klein R, Cooper LS, et al. Methods for evaluation of retinal microvascular abnormalities associated with hypertension/sclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ophthalmology*. 1999;106:2269-80.
7. Goto I, Katsuki S, Ikui H, Kimoto K, Mimatsu T. Pathological studies on the intracerebral and retinal arteries in cerebrovascular and noncerebrovascular diseases. *Stroke*. 1975;6:263-9.
8. Pose Reino A, Gonzalez-Juanatey JR, Castroviejo M, Valdes L, Estevez JC, Mendez I, et al. Relation between left ventricular hypertrophy and retinal vascular changes in mild hypertension. *Med Clin (Barc)*. 1997;108:281-5.
9. Fuchs FD, Maestri MK, Bredemeier M, Cardozo SE, Moreira FC, Wainstein MV, et al. Study of the usefulness of optic fundi examination of patients with hypertension in a clinical setting. *J Hum Hypertens*. 1995;9:547-51.
10. Maestri MM, Fuchs SC, Ferlin E, Pakter HM, Nunes G, Moraes RS, et al. Detection of arteriolar narrowing in fundoscopic examination: evidence of a low performance of direct ophthalmoscopy in comparison with a microdensitometric method. *Am J Hypertens*. 2007;20:501-5.
11. Couper DJ, Klein R, Hubbard LD, Wong TY, Sorlie PD, Cooper LS, et al. Reliability of retinal photography in the assessment of retinal microvascular characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Ophthalmol*. 2002;133:78-88.
12. Muñoz Negrete FJ. ¿Es necesaria la exploración sistemática del fondo de ojo en la hipertensión arterial? *Studium Ophthalmologicum XXVI*. 2008:141.
13. Alibrahim E, Donaghue KC, Rogers S, Hing S, Jenkins AJ, Chan A, et al. Retinal vascular caliber and risk of retinopathy in young patients with type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 2006;113:1499-503.

14. Klein R, Klein BE, Moss SE, Wong TY. Retinal vessel caliber and microvascular and macrovascular disease in type 2 diabetes: XXI: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology*. 2007; 114:1884-92.
15. Klein R, Klein BE, Moss SE, Wong TY, Hubbard L, Cruickshanks KJ, et al. The relation of retinal vessel caliber to the incidence and progression of diabetic retinopathy: XIX: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:76-83.
16. Rogers SL, Tikellis G, Cheung N, Tapp R, Shaw J, Zimmet PZ, et al. Retinal arteriolar caliber predicts incident retinopathy: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle (AusDiab) study. *Diabetes Care*. 2008 ;31:761-3.
17. Cheung N, Tikellis G, Wang JJ. Diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2007 ;114:2098-9.
18. Keith NM, Wagener HP, Barker NW. Some different types of essential hypertension: their course and prognosis. *Am J Med Sci*. 1974;268:336-45.
19. Scheie HG. Evaluation of ophthalmoscopic changes of hypertension and arteriolar sclerosis. *AMA Arch Ophthalmol*. 1953 ;49:117-38.
20. Kagan A, Aureli E, Dobree J. A note on signs in the fundus oculi and arterial hypertension: conventional assessment and significance. *Bull World Health Organ*. 1966;34:955-60.
21. Pose-Reino A, Gomez-Ulla F, Hayik B, Rodriguez-Fernandez M, Carreira-Nouche MJ, Mosquera-Gonzalez A, et al. Computerized measurement of retinal blood vessel calibre: description, validation and use to determine the influence of ageing and hypertension. *J Hypertens*. 2005;23:843-50.
22. Pose-Reino A, Rodriguez-Fernandez M, Hayik B, Gomez-Ulla F, Carrera-Nouche MJ, Gude-Sampedro F, et al. Regression of alterations in retinal microcirculation following treatment for arterial hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8:590-5.
23. Hayik B. Medida del calibre vascular retiniano en la población normal y en pacientes con hipertensión arterial (tesis doctoral). Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2002.
24. Pose-Reino A, Pena Seijo M, Gonzalez Penedo M, Ortega Hortas M, Rodriguez Blanco M, Vega P, et al. [Estimation of the retinal microvascular calibre in hypertensive patients with the snakes semiautomatic model]. *Med Clin (Barc)*. 2010 ;135:145-50.
25. Paul L. Kaufman, Albert Alm. Adler, *Fisiología del ojo*. 10ª ed. Madrid: Ed. Elsevier;2004.

26. Alm A, Bill A. The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Acta Physiol Scand.* 1972 ;84:306-19.
27. Alm A, Bill A. The oxygen supply to the retina. I. Effects of changes in intraocular and arterial blood pressures, and in arterial P O<sub>2</sub> and P CO<sub>2</sub> on the oxygen tension in the vitreous body of the cat. *Acta Physiol Scand.* 1972 ;84:261-74.
28. Alm A. Ocular Blood Flow in Glaucoma: Means, Methods and Measurements: Proceedings of a Meeting, Held in the Chateau de Bellinglise Near Paris Under de Auspices of the European Glaucoma Society, September 9-10, 1988. Holanda: Ed Kugler and Ghedini;1989. p. 61-64.
29. Pasquale L. , Jonas J. , Anderson D. Anatomy and physiology. En Weinreb RN. , Harris A. Ocular Blood Flow in Glaucoma: Means, methods and measurements. Holanda: Ed Kluger Publications; 1989. p. 5-9.
30. Dollery CT, Hill DW, Hodge JV. The response of normal retinal blood vessels to angiotensin and noradrenaline. *J Physiol.* 1963;165:500-7.
31. Ramalho PS, Dollery CT. Hypertensive retinopathy. Caliber changes in retinal blood vessels following blood-pressure reduction and inhalation of oxygen. *Circulation.* 1968;37:580-8.
32. Harris A, Ciulla TA, Chung HS, Martin B. Regulation of retinal and optic nerve blood flow. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:1491-5.
33. Haefliger IO, Meyer P, Flammer J, Luscher TF. The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology? *Surv Ophthalmol.* 1994;39:123-32.
34. Tesfamariam B, Halpern W. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in resistance arteries from hypertensive rats. *Hypertension.* 1988;11:440-4.
35. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-5.
36. De Mey JG, Gray SD. Endothelium-dependent reactivity in resistance vessels. *Prog APPL MICROCIRC.* 1995;8:181-7.
37. Diederich D, Yang ZH, Buhler FR, Luscher TF. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol.* 1990;258:H445-51.

38. Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, Heublin DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*. 1991;325:997-1001.
39. Hayreh SS. Hypertensive fundus changes. En: Guyer DR ed. *Retina- Vitreous-Mácula*. Philadelphia: W. B. Saunders Co; 1999. p. 345-71.
40. Hayreh SS, Servais GE, Viridi PS. Retinal arteriolar changes in malignant arterial hypertension. *Ophthalmologica*. 1989;198:178-96.
41. Bek T. Diabetic maculopathy caused by disturbances in retinal vasomotion. A new hypothesis. *Acta Ophthalmol Scand*. 1999;77:376-80.
42. Braun RD, Linsenmeier RA, Yancey CM. Spontaneous fluctuations in oxygen tension in the cat retina. *Microvasc Res*. 1992;44:73-84.
43. William Mackenzie Centenary Symposium on the Ocular Circulation in Health and Disease (1968: Glasgow, Scotland). The William Mackenzie Centenary Symposium on the Ocular Circulation in Health and Disease: proceedings of a symposium held at the Royal College of Physicians and Surgeons of Glasgow 23rd-24th September 1968 / edited by J. Stanley Cant. London: Kimpton, 1969.
44. Boyd TAS, de Margerie J. Caliber of retinal arterioles in hypertension. *Trans Canad Ophthal Soc*. 1960;23:65-76.
45. Kagan A, Aurell E, Tibblin G. Signs in the fundus oculi and arterial hypertension: unconventional assessment and significance. *Bull World Health Organ*. 1967;36:231-41.
46. Hodge JV, Parr JC, Spears GF. Comparison of methods of measuring vessel widths on retinal photographs and the effect of fluorescein injection on apparent retinal vessel calibers. *Am J Ophthalmol*. 1969;68:1060-8.
47. Sánchez-Salorio M. *Retinopatías vasculares*. Madrid: Ed. Grafinsa; 1971.
48. Parr JC, Spears GF. General caliber of the retinal arteries expressed as the equivalent width of the central retinal artery. *Am J Ophthalmol*. 1974 ;77:472-7.
49. Parr JC, Spears GF. Mathematic relationships between the width of a retinal artery and the widths of its branches. *Am J Ophthalmol*. 1974;77:478-83.
50. Brinchmann-Hansen O. The light reflex on retinal arteries and veins. A theoretical study and a new technique for measuring width and intensity profiles across retinal vessels. *Acta Ophthalmol Suppl*. 1986;179:1-53.
51. Delori FC, Fitch KA, Feke GT, Deupree DM, Weiter JJ. Evaluation of micrometric and microdensitometric methods for measuring the width of retinal vessel



- images on fundus photographs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1988;226:393-9.
52. Eaton AM, Hatchell DL. Measurement of retinal blood vessel width using computerized image analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988;29:1258-64.
53. George GS, Wolbarsht ML, Landers MB, 3rd. Reproducible estimation of retinal vessel width by computerized microdensitometry. *Int Ophthalmol*. 1990; 14:89-95.
54. Meehan RT, Taylor GR, Rock P, Mader TH, Hunter N, Cymerman A. An automated method of quantifying retinal vascular responses during exposure to novel environmental conditions. *Ophthalmology*. 1990;97:875-81.
55. Newsom RS, Sullivan PM, Rassam SM, Jagoe R, Kohner EM. Retinal vessel measurement: comparison between observer and computer driven methods. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1992;230:221-5.
56. Rassam SM, Patel V, Brinchmann-Hansen O, Engvold O, Kohner EM. Accurate vessel width measurement from fundus photographs: a new concept. *Br J Ophthalmol*. 1994;78:24-9.
57. Stanton AV, Mullaney P, Mee F, O'Brien ET, O'Malley K. A method of quantifying retinal microvascular alterations associated with blood pressure and age. *J Hypertens*. 1995 ;13:41-8.
58. Wu DC, Schwartz B, Schwoerer J, Banwatt R. Retinal blood vessel width measured on color fundus photographs by image analysis. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*. 1995:33-40.
59. Sharrett AR, Hubbard LD, Cooper LS, Sorlie PD, Brothers RJ, Nieto FJ, et al. Retinal arteriolar diameters and elevated blood pressure: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 1999;150:263-70.
60. Knudtson MD, Lee KE, Hubbard LD, Wong TY, Klein R, Klein BE. Revised formulas for summarizing retinal vessel diameters. *Curr Eye Res*. 2003 ;27:143-9.
61. Hemminki V, Kahonen M, Tuomisto MT, Turjanmaa V, Uusitalo H. Determination of retinal blood vessel diameters and arteriovenous ratios in systemic hypertension: comparison of different calculation formulae. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007 ;245:8-17.
62. Wong TY, Knudtson MD, Klein R, Klein BE, Meuer SM, Hubbard LD. Computer-assisted measurement of retinal vessel diameters in the Beaver Dam Eye Study: methodology, correlation between eyes, and effect of refractive errors. *Ophthalmology*. 2004 ;111:1183-90.

63. Li H, Hsu W, Lee ML, Wong TY. Automatic grading of retinal vessel caliber. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2005;52:1352-5.
64. Ruggeri A, Grisan E, De Luca M. An automatic system for the estimation of generalized arteriolar narrowing in retinal images. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2007;2007:6464-7.
65. Tramontan L, Grisan E, Ruggeri A. An improved system for the automatic estimation of the Arteriolar-to-Venular diameter Ratio (AVR) in retinal images. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2008;2008:3550-3.
66. Ortega M, Barreira N, Novo J, Penedo MG, Pose-Reino A, Gomez-Ulla F. Sirius: a web-based system for retinal image analysis. *Int J Med Inform.* 2010 ;79:722-32.
67. Saez M. , González-Vázquez S. , Gonzalez - Penedo M. , Barcelo M. A. , Pena-Seijo M. , Toll de Tuero G. , Pose- Reino A. Depelopment of an automated system to classify retinal vessels into arteries and veins. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2012;108:367-76.
68. Muramatsu C, Hatanaka Y, Iwase T. , Hara T. , Fujita H. Automated Selection of major arteries and veins for measurement of arteriolar- to-venular diameter ratio on retinal fundus images. *Comput Med Imaging Graph.* 2011; 35:472-80.
69. Niemeijer M, Xu X, Dumitrescu AV, Gupta P, van Ginneken B, Folk JC, et al. Automated measurement of the arteriolar-to-venular width ratio in digital color fundus photographs. *IEEE Trans Med Imaging.* 2011;30:1941-50.
70. Dimmitt SB, West JN, Eames SM, Gibson JM, Gosling P, Littler WA. Usefulness of ophthalmoscopy in mild to moderate hypertension. *Lancet.* 1989;1:1103-6.
71. Aoki N, Horibe H, Ohno Y, Hayakawa N, Kondo R. Epidemiological evaluation of fundusoscopic findings in cerebrovascular diseases. III. Observer variability and reproducibility for fundusoscopic findings. *Jpn Circ J.* 1977;41:11-7.
72. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med.* 1997 Nov 24;157:2413-46.
73. Parr JC. Hypertensive generalised narrowing of retinal arteries. *Trans Ophthalmol Soc N Z.* 1974;26:55-60.
74. Vázquez SG, Cancela B, Barreira N, Penedo MG, Rodríguez-Blanco M, Pena M, et al. Improving Retinal Artery and Vein Classification by Means of a Minimal Path Approach. *Machine Vision and Applications.* 2012. p: 1-12.
75. Vázquez SG, Barreira N, Penedo MG, Rodríguez-Blanco M, Gómez-Ulla F, González A, et al. Automatic Arteriovenous Ratio Computation: Emulating the Experts. En: *Tecnological Innovation for Value Creation.* Costa da Caparica,

- Lisboa, Portugal. Editorial Springer Berlin Heidelberg. 2012. p: 563-70. Third IFIP WG 55/SOCOLNET Doctoral Conference on Computing, Electrical and Industrial Systems, DoCEIS; Costa da Caparica, Lisbon, Portugal.
76. Penedo MG, González S, Barreira N, Sáez M, Pose Reino A, Rodríguez-Blanco M. Arteriovenous ratio calculation using image processing techniques. Volume 1, Chapter 13. En: *Image Analysis and Modeling in Ophthalmology*: CRC Press (Taylor & Francis). (Pendiente de publicación)
  77. Vázquez SG, Barreira N, Penedo MG, Rodríguez-Blanco M. The Significance of the Vessel Registration for a Reliable Computation of Arteriovenous Ratio. En: *Image, Analysis and Recognition*. Aveiro, Portugal. Ed: Springer Berlin Heidelberg. 2012. pp:347-54.
  78. Lopez A, Lloret J, Serrat J, Villanueva L. Multilocal creaseness base don the level set extrinsic curvature. *Computer Vision and Image Understanding*. 2000;77:111-4.
  79. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999;8:135-60.
  80. Bland JM, Altman DG. Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *J Biopharm Stat*. 2007;17:571-82.
  81. Krippendorff K. Estimating the reliability, systematic error, and random error of interval data. *Educational and Psychological Measurement*. 1970;30:61-70.
  82. Wilson TM, Constable IJ, Cooper RL, Alder VA. Image splitting--a technique for measuring retinal vascular reactivity. *Br J Ophthalmol*. 1981;65:291-3.
  83. Skovborg F, Nielsen AV, Lauritzen E, Hartkopp O. Diameters of the retinal vessels in diabetic and normal subjects. *Diabetes*. 1969;18:292-8.
  84. Delori FC, Gragoudas ES. Examination of the ocular fundus with monochromatic light. *Ann Ophthalmol*. 1976; 8:703-9.
  85. Heier H, Brinchmann-Hansen O. Reliable measurements from fundus photographs in the presence of focusing errors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989 ;30:674-7.
  86. Nagel E, Vilser W, Lindloh C, Klein S. [Measuring retinal vascular diameter using the scanning laser ophthalmoscope and computer. Initial results]. *Ophthalmologie*. 1992 ;89:432-6.
  87. Wong TY, Klein R, Couper DJ, Cooper LS, Shahar E, Hubbard LD, et al. Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet*. 2001;358:1134-40.

88. Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Tielsch JM, et al. Retinal arteriolar narrowing and risk of coronary heart disease in men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA*. 2002;287:1153-9.
89. Wong TY, Duncan BB, Golden SH, Klein R, Couper DJ, Klein BE, et al. Associations between the metabolic syndrome and retinal microvascular signs: the Atherosclerosis Risk In Communities study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 ;45:2949-54.
90. Bracher D, Dozzi M, Lotmar W. Measurement of vessel width on fundus photographs. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 1979 2;211:35-48.
91. Behrendt T. A retinographic survey of fundus changes. The arteriovenous crossing phenomena. *Am J Ophthalmol*. 1960;50:314-24.
92. Sandor T, Rhie FH, Soeldner JS, Gleason RE, Rand LI. Reproducibility of the densitometric analysis of fluorescein angiograms. *Int J Biomed Comput*. 1981 ;12:401-18.
93. Wong TY, Klein R, Klein BE, Tielsch JM, Hubbard L, Nieto FJ. Retinal microvascular abnormalities and their relationship with hypertension, cardiovascular disease, and mortality. *Surv Ophthalmol*. 2001;46:59-80.
94. Cheung N, Rogers SL, Donaghue KC, Jenkins AJ, Tikellis G, Wong TY. Retinal arteriolar dilation predicts retinopathy in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2008;31:1842-6.
95. Pakter HM, Fuchs SC, Maestri MK, Moreira LB, Dei Ricardi LM, Pamplona VF, et al. Computer-assisted methods to evaluate retinal vascular caliber: what are they measuring? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:810-5.